平成 17 年度成果報告

知的基盤創成・利用促進研究開発事業

臨床検査用標準物質の研究開発

（独）新エネルギー・産業技術総合開発機構

委託先　（独）産業技術総合研究所

成果報告書目次

■　１．事業目的および成果の概要 1
１－１　事業目的 1
１－２　事業概要 1
１－３　成果の概要 4
１－４　目的に照らした達成状況 6
■　２．成果の詳細 8
２－１　標準化基本検討委員会 8
２－１－１　目　的 8
２－１－２　委員会構成 8
２－１－３　活動総括 9
２－２　実試料系標準物質の研究開発 10
２－２－１　総　括 10
２－２－２　実施態勢 14
２－２－３　各論 17
２－２－３－１　血液ガス 17
２－２－３－２　グルコース 34
２－２－３－３　尿酸 43
２－２－３－４ クレアチニン 51
２－２－３－５　コリンエステラーゼ 59
２－２－３－６　グリコアルブミン 66
２－２－３－７　イオン化カルシウム 72
２－２－３－８　ヘモグロビン A1c（HbA1c） 80
２－２－３－９　インスリン、C-ペプチド、コルチゾール 86
２－２－３－１０　HDL-コレステロール、LDL-コレステロール 101
２－２－３－１１　アルブミン 110
２―２－３－１２　膵型アミラーゼ 121
２－２－３－１３　血清 C 反応性蛋白質（CRP） 125
２－３　純物質系標準物質の研究開発 138
２－３－１　研究背景 138
２－３－２　C 反応性蛋白 139
２－４　実試料系標準物質の調査研究 154
２－４－１　総　括 154
２－４－２　各　論 157
２－４－２－１　尿中電解質成分 157
２－４－２－２　尿中生化学成分 170
２－４－２－３　血清無機リン 188
２－４－２－４　血清前立腺特異抗原（PSA） 196
２－４－２－５　血清抗核抗体 199

２－４－２－６　血清リチウム（Li）.....204
２－４－２－７　血清総ビリルビン.....227
■　３．外部発表、講演等.....243
■　４．謝　辞.....245

■ １．事業目的および成果の概要

１－１　事業目的

健康診断や病院での血液や尿等を用いた臨床検査による検査データは、個人の健康管理、医学の基礎データ、医学研究の基本情報である。しかしながら、医療計量や医療検査機械システムにより得られる検査データは、測定機器間、測定方法間、検査機関間において相互に互換性が確保されていないのが現実である。このため、診断に用いる臨床検査データの基準値が病院ごとに異なる、あるいは個人の健康診断や臨床検査データの継続性が保てないなどの問題が存在し、膨大な臨床検査データが有効に活用されていないものと考えられる。

本研究開発では、医療計量及び医療検査機械システムにおける測定結果を科学的に信頼のあるものにし、かつ、検査機関相互の検査データに互換性を持たせるため、基本的な臨床検査項目について、末端の検査機関で用いられる標準物質から高位の標準物質までのトレーサビリティ体系を構築することを目的とする。

この結果として、医療計量の結果得られたデータに科学的（計測学的）な信頼性を付与し、また、検査機関が異なっても検査データの互換性を確保することができるようになる。すなわち、臨床データの互換性が空間的にも（何処でも）、時間的にも（いつでも）確保できるようになり、医療や医学研究の基礎情報としての信頼性が向上し、また、個人の健康管理データとしての連続性が確保されるようになる。これにより、以下の効果が期待できる。

①１回の検査結果でも、より適切な医療を実現できる。

②個人の長期間の検査データを健康管理や病気の診断等へ活用することができ、個人差を踏まえた適切な健康管理や医療の実現に大きく寄与することができる。

③現在行われている臨床検査の１割以上が不要な重複検査であるといわれているが、それを無くすことができる。

④日本の多くの企業が供給している医療検査機械システム（検査機器及び検査試薬）について世界で信頼を獲得することができ、国際競争力を強化することができる。

また、本研究開発は、医療分野の研究開発にとって不可欠な検査データや健康状態等に係る日本全体としてのデータベースを構築するための基盤となる。すなわち、データに科学的な信頼性を付与し、検査機関毎のデータに互換性を確保することができることから、これまで集積しても無意味であった、臨床検査結果を集積することにより、意味のあるデータ群として解析することにより有用な情報を得ることができるようになる。

１－２　事業概要

本研究開発では、最終的には、国際的にも認められる臨床検査用標準物質の開発を目指し、３年間で実試料系標準物質としては 20 種類程度の開発を行う。これらは、初診時に必須な検査項目と内分泌疾患の病態識別、循環器系疾患や糖尿病患者の治療の判断に必須な項目等重要な項目であり、いずれも臨床側から早急な標準物質の供給が求められているものである。また、これらの項目は生活習慣病の予防に必要な検査項目の多くを包含するものである。一方、現在、世界的にみても認証標準物質が開発されていないために、トレーサビリティ体系が確立されていない純物質系タンパク質を中心に、現在供給されているメーカーレベルの標準物質をトレーサビリティの

確保された標準物質へ引き上げることを目的に、３種類程度の純物質系標準物質を開発する。

さらに、検査項目の中で量的にそのほとんどを占めるが、現時点ではすぐに高位の標準物質開発に着手することが困難な検査項目については、標準物質の候補となる製造業者の校正物質の調査を行い、それらの中から共同実験により標準物質の候補となる校正物質の選定を行う。

３年間の NEDO 委託事業期間内に開発等を計画している標準物質の具体的な項目に関して表１にまとめる。本研究開発により、初期診療に必要な項目の大部分および臨床側から早急な標準物質供給が求められている検査項目について標準物質を整備することが出来ると共に、一部の項目については、国際単位系にまで遡及でき、理想的な臨床検査のトレーサビリティ体系を社会に示すことができる。

また、現在、計量標準・標準物質の整備は国等により行われているところであるが、特に安全・安心な国民生活の実現に向けた臨床検査分野の計量標準・標準物質に関しては未整備な部分が多く、速やかな整備が求められている。本事業により、計測のトレーサビリティをほとんど認識していなかった臨床検査分野の関係者にその重要性を認識させることができる。

≪用語の説明≫

①実試料系標準物質：実際の試料と類似した組成を持ち、その中の目的成分濃度が決定された標準物質。臨床検査の分野では、血清、尿などが分析試料であるため、標準物質もこれらの試料をもとに調製される場合が多い。

②純物質系標準物質:確定した純度を有する物質。それらを単純に溶解した標準液もここに含む。

③校正物質：メーカーが独自に設定したもので、主に自社の臨床検査機器・試薬の値付けに用いたり、あるいは検査機関等で自社の臨床検査薬を使用する際の校正用として供給したりする物質をここでは区別のためこのように呼ぶ。また、キャリブレータともいう。

④実用標準物質：実試料系標準物質のうちで、計量学的にトレーサビリティが確立された手法により値付けられた標準物質を呼ぶ。一般的に常用標準物質（後述）の高位標準物質としてその値付けに用いられる。

⑤常用標準物質：実試料系標準物質のうちで、学会等で合意された測定法あるいは日常測定操作法による共同実験で値付けられた標準物質を呼ぶ。一般的にメーカー等の社内の標準物質の校正に用いる。

表１　本研究で開発する標準物質一覧

		項目	平成17年度	平成18年度	平成19年度
産総研で研究実施	高純度物質系				
		C反応性蛋白(CRP)	→	→	
		アルブミン (ALB)		→	→
		コルチゾール		→	→
	実試料系 I				
		血液ガス	→		
		グルコース(GLU)	→		
		尿酸(UA)	→		
		クレアチニン(CRE)	→		
		コリンエステラーゼ(CHE)	→	→	
		グリコアルブミン (GA)	→	→	→
		イオン化Ca	→	→	
		ヘモグロビンA1c	→	→	→
		総カルシウム (Ca)		→	
		総マグネシウム (Mg)		→	
		血清鉄		→	
		尿素(UN)		→	
		コルチゾール	→	→	→
		インスリン	→	→	→
		C-ペプチド(CPR)	→	→	→
日本臨床検査標準化協議会に委託	実試料系 II				
		HDL-コレステロール (HDL-C)	→	→	→
		LDL-コレステロール (LDL-C)	→	→	→
		アルブミン二次標準物質	→	→	→
		アルブミン(ALB):尿	→	→	→
		アルブミン(ALB):血清	→	→	→
		膵型アミラーゼ (P-AMY)	→	→	→
		血清CRP標準物質	→	→	→
		リパーゼ	→	→	→
	実試料系標準物質の調査研究項目				
		尿中ナトリウム (Na)	→		
		尿中 カリウム (K)	→		
		尿クロール (ＣＬ)	→		
		尿中マグネシウム (Mg)	→		
		尿中 カルシュウム (Ca)	→		
		尿中尿素窒素 (ＵＮ)	→		
		尿中尿酸 (UA)	→		
		尿中 クレアチニン (Cre)	→		
		尿中アミラーゼ (AMY)	→		
		尿中グルコース (GLU)	→		
		尿中無機リン (IP)	→		
		血清無機リン (IP)	→		
		血清PSA	→		
		血清抗核抗体	→		
		血清Li	→		
		ジゴキシン		→	
		テオフィリン		→	
		β２－マイクログロブリン		→	
		エストラジオール		→	
		プロゲステロン		→	
		テストステロン		→	
		甲状腺刺激ホルモン		→	
		サイロキシン		→	
		βヒト絨毛性ゴナドトロピン		→	
		FDP		→	
		Dダイマー		→	
		CEA		→	
		AFP		→	
		CA125		→	
		フェリチン		→	

１－３　成果の概要

初診時に必須な検査項目のうち標準物質が未整備なものや臨床側より要望の高い検査項目について、末端ユーザーから高位標準物質までのトレーサビリティ体系の構築を念頭に、それぞれ実試料系標準物質および純物質系標準物質の開発・整備を行った。標準化基本検討委員会において全体の統括を行い、開発の方向性についての合意を得た上で、最終的には、国際的にも認められる臨床検査用標準物質の開発を目指した。また、現時点で高位の標準物質開発に着手することが困難な項目については、現状の問題点を把握して、開発についての見通しを得ることを目的として調査研究を行った。具体的な項目は以下の通りである。

（１）「標準化基本検討委員会」

平成 17 年 12 月 12 日に開催し、標準物質開発計画、進捗状況、今後の方向性についての議論し、本年度の開発件研究方針を決定した。

（２）「実試料系標準物質の研究開発」

１）実試料系標準物質のプロトタイプについての検証実験と JCTLM への登録申請

項目：血液ガス、グルコース、尿酸、クレアチニン

内容：これらの項目については、これまでの日本臨床化学会における検討から調製方法は確立されているため、それに基づいてプロトタイプを調製し、実用標準物質としての検証実験を行った。その結果、作製したプロトタイプが候補標準物質として十分な特性を有していることが明らかになり、当該検査項目における高位標準物質として JCTLM（検査医学におけるトレーサビリティに関する共同委員会）データベースへ登録申請することとした。JCTLM 登録申請のさいに科学的な根拠として提出する文書として、プロトタイプ作製のためのプロトコルを英文化した。上記 4 項目のうち、グルコース、尿酸、クレアチニンについては 2006 年 4 月第 3 サイクルに登録した。血液ガスに関しては、第 4 サイクルに登録する。

２）実試料系標準物質のプロトタイプの作製

項目：コリンエステラーゼ、グリコアルブミン、イオン化カルシウム、ヘモグロビン A1c、アルブミン（実用標準物質、血清アルブミン常用標準物質、尿アルブミン標準物質の３種類）、膵型アミラーゼ、血清 C 反応性蛋白、HDL-コレステロール、LDL-コレステロール、インスリン、C-ペプチド、コルチゾール

内容：コリンエステラーゼについてはヒト血清ベースの候補品を選定し、日本臨床化学会勧告法（JSCC 法）に基づいた値付けのための共同実験を実施した。その結果、血清コリンエステラーゼ活性測定用の酵素標準物質を設定した。グリコアルブミンについては、基準測定操作法および血清標準物質の性状規格を決定した。基準測定操作法はアルブミン糖化リジン量をデオキシアミノヘキシトール（DAH）化後加水分解－LC/ID-MS によって求めることとし、性状規格としての密度、蛋白成分、含窒素成分、還元剤成分、脂質成分について規定した。イオン化カルシウムに関しては、候補標準物質を選定し、標準物質の値付け方法および取扱説明書を作成した。これらの文書の英文化を行い、JCTLM 登録申請の準備を行った。ヘモグロビン A1c(HbA1c)については、IFCC 法を基準測定操作法とし、JSCC 法として KO500 法を決定し、常用全血標準物質のプロトタイプを作製した。本プロトタイプの性状については、総ヘモブロビン(Hb)濃度、HbF、MetHb、グルタチオンアダクト、異常 Hb、血漿成分について規定した。

アルブミンについては、患者尿を用いて作製した尿中アルブミン実試料標準物質に対して、尿アルブミン測定試薬販売企業が参加して実施した共同実験 - IRMM（Institute for Reference Materials and Measurements, EU）ERM-DA470 を用いた値付けの共同実験ーを行った結果から、実用標準物質から血清用および尿用の常用標準物質に対してトレーサビリティを確保できることが明らかになった。血清 C 反応性蛋白については DNA 組換え手法で作製した組換え型ヒト CRP(rCRP)を標準物質候補品として、標準物質の性状や値付け方法を決定し、ヒト CRP 実用標準物質および常用標準物質のプロトタイプを作製した。また、膵型アミラーゼに関しては、常用基準測定法は唾液型アミラーゼ（S-AMY とする）活性阻害抗体（抗 S-AMY 抗体）を用いて S-AMY 活性をブロックした後、JSCC アミラーゼ測定勧告法で P-AMY 活性を測定するできることを示し、ヒト膵型アミラーゼを原料として標準物質を設定できることを示した。

HDL-コレステロール、LDL-コレステロールについては、各社の市販キット、キャリブレーター トレーサビリテイ体系、実試料標準物質に望まれる性状、品質等の調査を行った。市販キットの互換性の調査、市販キャリブレーター、コントロールを実試料標準物質候補とした場合の血清測定値収束性の効果、メーカーが開発している複数の候補品による血清測定値の収束性の効果について各社試薬を用いた比較試験を行った。その結果、HDL-C については HECTEF SRC/NCCLS 処方/HDL-C 中濃度を、LDL-C については HECTEF SRC/NCCLS 処方/LDL-C 低濃度を候補品の１つとして選択できた。

インスリン、C-ペプチド、コルチゾールについては、実試料系標準物質に望まれる性状についての知見を得るため、WHO（世界保健機関）標準品、NIST 認証標準物質（米国標準技術研究所）、IRMM 認証標準物質や試薬類を用いて血清や緩衝液をベースとするいくつかの試料を調製して、各社試薬での共同実験を準備した。このうちインスリンでは国際標準品（PNIBSC code66/304（Human insulin）あるいは NIBSC code83/500（Insulin crystal））を頂点とするトレーサビリティ連鎖を構成して血清ベースの実試料標準物質を設定する系、C-ペプチドについては国際標準品（NIBSC 84/510 精製蛋白）を頂点とするトレーサビリティ連鎖を構成して血清ベースの実試料標準物質を設定する系、また、コルチゾールについては純品（NIST SRM 921）および血清系（IRMM ERM DA-192 および DA-193）を頂点とするトレーサビリティ連鎖を構成して血清ベースの実試料標準物質を設定する系が可能であることが検証された。

（３）「純物質系標準物質の研究開発」

項目：C 反応性蛋白

内容：一次標準物質となりうる C 反応性蛋白標準物質の開発を目指し、今年度は、まず候補品として組換え型ヒト C 反応性蛋白緩衝溶液を選定し、C 反応蛋白濃度を SI トレーサブルに値付けする方法について検討した。値付け方法としては、アミノ酸分析、窒素分析法（ケルダール法、燃焼発光式窒素分析法等）の適用の可能性について検討し、さらに、具体的な分析条件などについて詳細に検討を行った。C 反応性蛋白溶液を用いた予備検討において、アミノ酸分析と窒素分析法でほぼ同程度の結果を得ることができた。また、安定性試験に向けて試験方法の検討を行い、カラムクロマトグラフィおよびアフィニティクロマトグラフィによる方法の確立を行った。

（４）「実試料系標準物質の調査研究」

項目：尿中ナトリウム、尿中カリウム、尿中塩素、尿中マグネシウム、尿中カルシウム、尿中尿素窒素、尿中尿酸、尿中クレアチニン、尿中アミラーゼ、尿中グルコース、尿中無機リン、血

清無機リン、血清前立腺特異抗原（PSA）、血清抗核抗体、血清リチウム
内容：日常検査に汎用されている尿試料に関する項目群の中で、血清用実試料標準物質は入手できるが尿用標準物質が存在しない上記尿中 11 項目について尿用標準物質の作製を目指し、調査研究を実施した。また、血清汎用項目であるが、実試料系標準物質が存在しない血清無機リン、およびリチウムも同様に実試料標準物質を目指して調査研究を行った。何れの検査項目の場合もメーカー各社の試薬間測定値の互換性に関するデータが無いために、各社装置の互換性の調査及び実試料系標準物質を使用した収束性（市販キャリブレーターによる収束性の現状、血清標準物質による収束性の効果、人工尿候補品、ヒト尿標準物質候補品による収束性の効果など）を確認する共同実験を実施した。

その結果、尿中電解質成分および尿中生化学成分に関しては尿用実試料系標準物質を設定することの有効性が確認され、平成 18 年度以降、本 NEDO 委託事業において実用標準物質を開発することとなった。また、血清中の無機リン、リチウムおよび総ビリルビンに関しては、共同実験の結果から標準物質による各社キャリブレーターの収束性が確認され、尿用標準物質と同様に平成 18 年度には候補標準物質のマトリックスと濃度レベルを検討して実試料標準物質を作成する。血清前立腺特異抗原（PSA）については、血清（実試料系標準物質）ベースと緩衝液ベースの標準物質候補品を各社試薬用いて測定した結果について比較解析し、両標準物質候補品において測定結果に差がないことを確認した。その結果から、血清 PSA に関しては、実試料系標準物質を新たに開発する必要はなく、既存の高位標準物質を緩衝液に直接溶かして常用標準物質して使用できるという結論を得た。血清抗核抗体については、標準化の現状を調査し、それに基づき国内標準候補品として二つの標準品を選定し、標準化のプロトコルを検討した。平成 18 年度以降は、本年度選定した候補品を比較して国内標準品を選ぶとともに、標準化のためのプロトコルを作成する。

１－４　目的に照らした達成状況

１－３に記述したとおり、19 項目の標準物質開発を行っており、ほぼ予定通り進捗した。特に、実試料系標準物質のうち、グルコース、尿酸、クレアチニンについては、すべての開発を完了して、最終目標である JCTLM（臨床化学におけるトレーサビリティに関する共同委員会）データベースへのノミネーションを 2006 年 4 月に予定している。また、調査研究を行った項目のうち尿用標準物質および血清無機リン、リチウムについては、標準物質開発への道筋の見通しが得られた。特に、尿用標準物質に関しては、標準化基本検討委員会において、実試料系標準物質を開発するフェーズに入ることを決定し、平成 18 年度から本 NEDO 委託事業の一環として実試料系標準物質の研究開発を行う。本年度の成果を踏まえて、平成 18 年度には表 2 に示すような項目に関して開発研究を実施する。

表 2　平成 18 年度開発研究計画

	項目	平成17年度	平成18年度	平成19年度	備考
産総研で研究実施	高純度物質系				
	C反応性蛋白 (CRP)	→	→		
	アルブミン (ALB)	→	→	→	
	コルチゾール	→	→	→	
	実試料系 I				
	血液ガス	→	→		延長
	グルコース(GLU)	→			
	尿酸(UA)	→			
	クレアチニン(CRE)	→			
	コリンエステラーゼ(CHE)	→	→		
	グリコアルブミン (GA)	→	→	→	
	イオン化Ca	→	→		
	ヘモグロビンA1c	→	→		短縮
	総カルシウム (Ca)		→		
	総マグネシウム (Mg)		→		
	血清鉄		→		
	尿素(UN)		→		
	コルチゾール	→	→	→	
	インスリン	→	→	→	
	C-ペプチド(CPR)	→	→	→	
	尿中ナトリウム (Na)		→	→	新規(調査研究の成果)
	尿中 カリウム (K)		→	→	新規(調査研究の成果)
	尿クロール (CL)		→	→	新規(調査研究の成果)
	尿中マグネシウム (Mg)		→	→	新規(調査研究の成果)
	尿中 カルシウム (Ca)		→	→	新規(調査研究の成果)
	尿中尿素窒素 (UN)		→	→	新規(調査研究の成果)
	尿中尿酸 (UA)		→	→	新規(調査研究の成果)
	尿中 クレアチニン (Cre)		→	→	新規(調査研究の成果)
	尿中アミラーゼ (AMY)		→	→	新規(調査研究の成果)
	尿中グルコース (GLU)		→	→	新規(調査研究の成果)
	尿中無機リン (IP)		→	→	新規(調査研究の成果)
	血清無機リン (IP)		→	→	新規(調査研究の成果)
	血清ビリルビン (BIL)		→	→	新規(調査研究の成果)
	血清リチウム (Li)		→	→	新規(調査研究の成果)
日本臨床検査標準化協議会に委託	実試料系 II				
	HDL-コレステロール (HDL-C)	→	→	→	
	LDL-コレステロール (LDL-C)	→	→	→	
	アルブミン標準物質 (実用)	→	→		短縮
	アルブミン(ALB):尿標準物質 (常用)	→	→		短縮
	アルブミン(ALB):血清標準物質 (常用)	→	→		短縮
	膵型アミラーゼ (P-AMY)	→	→	→	
	血清C反応性蛋白 (CRP) 標準物質	→	→	→	
	リパーゼ	→	→	→	
	実試料系標準物質の調査研究項目				
	尿中ナトリウム (Na)	→			
	尿中 カリウム (K)	→			
	尿クロール (CL)	→			
	尿中マグネシウム (Mg)	→			
	尿中 カルシウム (Ca)	→			
	尿中尿素窒素 (UN)	→			
	尿中尿酸 (UA)	→			
	尿中 クレアチニン (Cre)	→			
	尿中アミラーゼ (AMY)	→			
	尿中グルコース (GLU)	→			
	尿中無機リン (IP)	→			
	血清無機リン (IP)	→			
	血清ビリルビン (BIL)	→			
	血清前立腺特異抗原 (PSA)	→			
	血清抗核抗体	→	→		延長
	血清リチウム (Li)	→			
	リウマチ因子 (RF)		→		
	ジゴキシン		→		
	テオフィリン		→		
	プロラクチン		→		
	黄体形成ホルモン		→		
	卵胞刺激ホルモン		→		
	エストラジオール		→		
	甲状腺刺激ホルモン		→		
	サイロキシン		→		
	サイログロブリン		→		
	β 2－マイクログロブリン		→		
	ヒト絨毛性ゴナドトロピン		→		
	癌胎児性抗原 (CEA)		→		
	α－フェトプロテイン (AFP)		→		
	フェリチン		→		
	フローサイトメトリー(FCM)		→		新規

■ ２．成果の詳細

２－１　標準化基本検討委員会

２－１－１　目　的

標準化基本検討委員会では、本委託事業において研究開発するメーカー標準物質、実試料系標準物質あるいは純物質系標準物質を現場レベルの臨床検査室から国家計量標準までのトレーサビリティ連鎖の各段階で活用できるようにするため、各サブテーマ「実試料系標準物質の研究開発」、「純物質系標準物質の研究開発」および「実試料系標準物質の調査研究」に関して、各開発および調査研究の方向性を検討し、進捗状況を報告・審議し、最終的に開発したものの妥当性を審議することを責務としている。本委託事業で研究する純物質系標準物質開発と実試料系標準物質開発を統括するとともに、それらを結びつけるための活動、また、実際にユーザーに供給される試薬メーカーレベルの標準物質までのトレーサビリティの構築を行うとともに、専門家や標準物質のユーザーなどの意見をとりまとめ、よりよい標準物質開発に反映させる。また、開発した標準物質について、国際的な認知を受けるため、「検査医学におけるトレーサビリティに関する共同委員会 (Joint Committee on Traceability in Laboratory Medicine: JCTLM)」の標準物質データベースへの登録申請作業を行う。

２－１－２　委員会構成

＜委員長＞

濱﨑　直孝	委員長日本臨床化学会　会長　（九州大学大学院　教授）

＜委員＞

渡邊　清明	日本臨床検査標準協議会　会長（日本臨床検査医学会　会長）
横川　信幸	（社）日本分析機器工業会　医療機器委員長
千葉　光一	独立行政法人　産業技術総合研究所　計測標準研究部門　副部門長
吉田　雅彦	経済産業省　産業技術環境局知的基盤課　課長
高木　康	日本臨床検査医学会　（昭和大学医学部　教授）
桑　克彦	日本臨床検査標準協議会　認証委員会委員長　（筑波大学大学院　助教授）
中原　一彦	日本医科器械学会　（独立行政法人　大学評価・学位授与機構　教授）
登　勉	日本臨床化学会　学術連絡委員会　委員長　（三重大学　医学部　教授）
金子　健史	日本臨床衛生検査技師会　精度管理部常務理事
大和　隆	日本臨床検査薬協会　技術委員会　副委員長
佐守　友博	日本衛生検査所協会　理事

＜ｵﾌﾞｻﾞｰﾊﾞｰ＞

高橋　昌行	経済産業省　産業技術環境局　知的基盤課
前川　一洋	NEDO　研究開発推進部　主幹
玉木　敏夫	NEDO　研究開発推進部　知的基盤グループ　主査

＜事務局＞

藤橋　和夫	日本臨床検査標準協議会

２－１－３　活動総括

平成 17 年度には、平成 17 年 12 月 12 日に臨床検査薬協会の会議室において委員会を開催し、各研究実行グループからの研究計画の提案を受けて、以下の方針を決定した。

純物質系標準物質開発としては、今年度は CRP 標準液の濃度決定の基礎検討を行う。また、これまでに探索的に行った BSA（ウシ血清アルブミン）のアミノ酸分析結果から、最適条件においてアミノ酸の回収率は 90%程度であることが報告され、今後、不純物の影響あるいは分析上の問題について検討すべきである。実試料系標準物質の開発研究に関して、16 項目の標準物質開発計画を承認して、本年度中にグルコース標準物質(血清)、クレアチニン標準物質(血清)および尿酸標準物質(血清)の開発を完了して、JCTLM に登録申請する。調査研究に関しては、16 項目に関して標準化に向けた現状の問題とその解決法に調査研究を行う。また、これらの開発研究を実際に行うに当たり、表 1 に示す研究実施体制を組む。

これらの決定と提言に基づいて平成 17 年度の研究開発が実施された。

表 1　研究実施体制

		臨床検査実用標準物質開発研究推進体制（案）　2005年8月9日現在				
		リーダ（併任研究者）	対象（H17年度開始）	標準化検討機関	対象（H18年度開始）	標準化検討機関
産総研で研究実施	純物質系	高津　章子　（産総研）	CRP	JSCC（酵素・試薬専門員会）		
		加藤　尚志　（産総研）	アルブミン	JSCC（酵素・試薬専門員会）		
		加藤　愛　（産総研）	コルチゾール			
	実試料系Ⅰ	桑　克彦　（筑波大）	血液ガス	JSCC（血液ガス・電解質専門員会）		
		≪代謝成分系標準物質≫	グルコース	JSCC（酵素・試薬専門員会）		
		福永　壽晴　（金沢医大）	クレアチニン	JSCC（酵素・試薬専門員会）		
		星野　忠夫　（病態解析研究所）	尿酸	JSCC（酵素・試薬専門員会）		
		武井　泉　（慶応大）				
			コリンエステラーゼ	JSCC（酵素・試薬専門員会）		
			イオン化Ca	JSCC（血液ガス・電解質専門員会）		
			ヘモグロビンA1c	JSCC（糖尿病関連指標専門員会）		
			グリコアルブミン	JSCC（糖尿病関連指標専門員会）		
		藤楯　和夫　（JCCLS）			総Ca	JSCC（血液ガス・電解質専門員会）
		≪電解質系標準物質≫			総Mg	JSCC（血液ガス・電解質専門員会）
					尿素	JSCC（酵素・試薬専門員会）
		千葉　光一　（産総研）	コルチゾール			
		≪ホルモン系標準物質≫	インスリン	JDS（糖尿病関連検査委員会）		
		竹越　博一　（筑波大）	CPR	JDS（糖尿病関連検査委員会）		
		桑　克彦　（筑波大）				
日本臨床検査標準協議会へ委託	実試料系Ⅱ	濱崎　直幸　（九大）	HDL-コレステロール	臨床検査医学会JSLM（標準委員会）		
		≪脂質系標準物質≫	LDL-コレステロール	JSCC		
		櫻林　郁之介　（自治医大）				
		桑　克彦　（筑波大）				
		美崎　英生　（カイノス）	アルブミン二次標準物質	JSCC（酵素・試薬専門員会）	リパーゼ	JSCC（酵素・試薬専門員会）
		≪タンパク・酵素系標準物質	アルブミン（血清）	JSCC（酵素・試薬専門員会）		
		伊藤　喜久　（旭川医大）	アルブミン（尿）	JSCC（酵素・試薬専門員会）		
		藤田　孝　（藤田保健衛生大学）	膵型アミラーゼ	JSCC（酵素・試薬専門員会）		
			血清CRP標準物質	JSCC（酵素・試薬専門員会）		
	調査研究	登　勉　（三重大学）	≪調査研究項目≫	JCCLS	≪調査研究項目≫	JCCLS
		藤楯　和夫　（JCCLS）	尿中ナトリウム（Na）	臨床検査薬協会	ジゴキシン	臨床検査薬協会
		大和　隆（臨薬協）	尿中 カリウム（K）		テオフィリン	
			尿クロール（CL）		β２－マイクログロブリン（free　β）	
		桑　克彦　（筑波大）	尿中マグネシウム（Mg）		エストラジオール	
		森下　芳孝　（三重大）	尿中 カルシュウム（Ca）		プロゲステロン	
		竹越　博一　（筑波大）	尿中尿素窒素（UN）		テストステロン	
		小田桐　恵美　（東京女子医大）	尿中尿酸（UA）		甲状腺刺激ホルモン	
		家入　蒼生夫　（独協医大）	尿中 クレアチニン（Cre）		サイロキシン	
		加野　象次郎　（東京逓信病院）	尿中アミラーゼ（ AMY ）		βヒト毬毛性ゴナドトロピン	
		福武　勝幸　（東京医大）	尿中グルコース（ GLU）		FDP	
		熊谷　俊一　（神戸大）	尿中無機リン（IP）		Dダイマー	
		小柴　賢洋　（神戸大学）	血清無機リン（IP）		CEA	
		富永　真琴　（山形大）	血清PSA（前立腺性特異抗原）		AFP	
			血清抗核抗体		CA125	
			血清Li		フェリチン	

２－２　実試料系標準物質の研究開発

２－２－１　総　括

１．研究の進め方

実試料系標準物質の研究開発は、学協会の専門委員会での作業との連携による方法ならびに標準化基本検討委員会の中に検討のためのワーキンググループ(WG)を設置による方法で行った
なお、本実施態勢については２－２－３項に記載した。

このうち日本臨床化学会（JSCC）の専門員会と連携した測定項目は、血液ガス、イオン化カルシム、グルコース、尿酸、クレアチニン、グリコアルブミン（GA）および血清Ｃ反応性蛋白(CRP)である。また、日本臨床検査標準協議会（JCCLS）の標準物質小委員会との連携した測定項目は、コリンエステラーゼ、ヘモグロビン A1c(HbA1c)および血清前立腺特異抗原（PSA）である。

標準化基本検討委員会を設置し、検討のための WG を関連の学協会との協力で組織した測定項目は、インスリン、C-ペプチド、コルチゾール、HDL-コレステロール、LDL-コレステロール、アルブミンおよび膵型アミラーゼである。

なお、実試料標準物質のプロトタイプの調整あるいは作製については、有限責任中間法人 HECTEF スタンダードレファレンスセンター、旭化成ファーマ㈱、シスメックス㈱およびオリエンタル酵母工業㈱の協力を得た。

２．結果のまとめ

実試料系標準物質の研究開発の結果は以下のごとくである。

（１）血液ガス

標準物質の値付け方法、認証書および取扱説明書が作成できた。かつこれらの文書の英文化が行われ、国際標準化のために JCTLM ノミネーションの準備ができた。

（２）グルコース

標準物質の値付け方法、認証書および取扱説明書が作成できた。かつこれらの文書の英文化が行われ、国際標準化のために Cycle Ⅲの JCTLM ノミネーションを行った。

（３）尿酸

標準物質の値付け方法、認証書および取扱説明書が作成できた。かつこれらの文書の英文化が行われ、国際標準化のために Cycle Ⅲの JCTLM ノミネーションを行った。

（４）クレアチニン

標準物質の値付け方法、認証書および取扱説明書が作成できた。かつこれらの文書の英文化が行われ、国際標準化のために Cycle Ⅲの JCTLM ノミネーションを行った。

（５）コリンエステラーゼ

１）血清コリンエステラーゼ活性測定用の酵素標準物質を設定した。

２）値付けの測定方法は、JSCC 勧告法を用いた JCCLS-SOP 法とした。

３）酵素標準物質は、性状を確定したヒト血清を用いた。値付けは JCCLS-SOP 法による共同実験方式で行った。

（６）グリコアルブミン

１）基準測定操作法および血清標準物質の性状規格について設定した。

２）基準測定操作法は、アルブミンの糖化リジン量の総量をデオキシアミノヘキシトール(DAH)化後塩酸水解―LC/ID-MS 法により求める。また、同時にアルブミン量を改良型 BCP 法で求める。得られた結果から、アルブミン量中のグリコアルブミンの比をとり、これをパーセントで表す。

３）血清標準物質の性状規格については、密度、蛋白成分、含窒素成分、還元剤成分、脂質成分について規定した。

（７）イオン化カルシウム

標準物質の値付け方法、認証書および取扱説明書が作成できた。かつこれらの文書の英文化が行われ、国際標準化のために JCTLM ノミネーションの準備ができた。

（８）ヘモグロビン A1c（HbA1c）

１）基準測定操作法と実試料標準物質の設定について検討した。

２）基準測定操作法は、国際的には IFCC 法(IFCC-SOP)としてβ鎖 N 末端ヘキサペプチドを HPLC 分画後 ESI-MS あるいは IC(イオンクロマトグラフィ）で測定する monoglycated hexapeptide 測定法が確立されている。これは全血標準物質への値付けに用いる。この方法による測定値は、従来臨床側が用いてきた DCCT 値とは異なることから、現在国内外のデータの互換性の確保のための作業が進行中である。

３）IFCC 法から精確さを伝達する実用的な基準測定操作法として、国内では HPLC を用いた KO500 法が組み立てられ、JSCC　SOP となる。本法では monoglycated hemoglobin が測定される。国内で用いる常用全血標準物質の値付けに本法が用いられる。

４）常用全血標準物質の性状規格を定めた。規定した成分は、総ヘモブロビン(Hb)濃度、HbF、MetHb、グルタチオンアダクト、異常 Hb、血漿成分である。これらの性状企画を有する試料の安定性は、-20℃保存で２ケ月間であった。

５）KO500 法を用いた共同実験方式により常用全血標準物質への値付けが可能となった。

（９）インスリン、C-ペプチド、コルチゾール

１）血清中のインスリン、C-ペプチド、コルチゾール測定について、測定値の互換性の現状、実試料標準物質の設定、値付けの測定方法の検討した。

２）測定値の互換性の現状については、インスリンでは、外部精度評価結果ではキット間の変動係数 CV（%）は、試料１が 16.1%、試料 2 が 13.9%であった。大きなキット間差はないものの、同じ測定値として取り扱うことが可能な 10%の基準を超えていた。各社から報告された患者試料を使用した相関関係については、傾きおよび切片から判断すると 10%を超えるキット間差は無かった。C-ペプチドについては、キット内 CV%は 2 濃度ともに 10%以下であった。キット間変動はいずれの試料でも 15～20%前後であった。ツインプロットから測定法間に系統誤差がみられた。コルチゾールについては、キット内 CV%は 2 濃度とも 7～13%であり、キット間 CV%は試料１で 11.9%、試料 2 で 6.5%であった。指摘されたプレクリニカルクッシング症候群の診断基準付近のレベルの試料 1 は、1.75～4.93 ug/dl で測定値にばらつきがみられた。

3) 実試料標準物質の設定については、インスリンでは、公的標準品としての国際標準品（PNIBSC code66/304（Human insulin）あるいは NIBSC code83/500（Insulin crystal））を頂点とするト

レーサビリティ連鎖を構成し、血清ベースの実試料標準物質を設定する。C-ペプチドについては、国際標準品（NIBSC 84/510 精製蛋白）を頂点とするトレーサビリティ連鎖を構成し、血清ベースの実試料標準物質を設定する。コルチゾールについては、国際標準品は設定されていない。純品（NIST SRM 921）および血清系（IRMM ERM DA-192 および DA-193）を頂点とするトレーサビリティ連鎖を構成し、血清ベースの実試料標準物質を設定可能であることが分かった。

4）値付けの測定方法については、インスイン、C-ペプチドは LC-MS、コルチゾールは ID-GC/MS が可能であることがわかった。

(10) HDL－コレステロール、LDL－コレステロール

1）血清 HDL－コレステロール（HDL-C）、血清 LDL－コレステロール（LDL-C）の測定において、市販試薬におけるデータの収束性を可能にするために HDL-C 及び LDL-C の実試料系標準物質の作製検討を行った。

2）試薬、キャリブレーター、トレーサビリティ等の調査をした上で、実試料系標準物質候補を探索する目的で、各メーカー使用のキャリブレーター、コントロール及び検討中の試料も含めて各メーカー試薬と組み合わせた場合の測定値収束性の効果を調査した。
その結果、HDL-C については HECTEF SRC/NCCLS 処方/HDL-C 中濃度を、LDL-C については HECTEF SRC/NCCLS 処方/LDL-C 低濃度を候補品の１つとして選択できた。

（11）アルブミン

1）ヒト血清アルブミンから高純度単量体アルブミンを調製した。

2）高純度単量体アルブミンを原料にして３種類の臨床検査用アルブミン標準物質（実用標準物質、血清用常用標準物質、尿用常用標準物質）を試作した。

3）３種類の標準物質の性状を評価し、規格値内であることを確認した。

4）３種類の標準物質の効果を市販測定キットを用いて検討した。実用標準物質については、その下位に位置する血清用常用標準物質および尿用常用標準物質へ、さらに、尿用常用標準物質から試薬校正物質（市販キット添付校正物質）への値の伝達性（transferability）が確認出来た。しかし、血清用常用標準物質から試薬校正物質への伝達性は測定試薬の原理上の問題で十分な伝達性が確保出来ず、伝達性が確保出来たのは「改良 BCP 法」のみで、BCG 法に問題があることが検証できた。

（12）膵型アミラーゼ

1）市販膵型アミラーゼ（P-AMY）測定キットの評価を実施した。その結果、相関係数は非常に良好であったが、基質により測定値に差が見られた。

4）常用基準測定法は唾液型アミラーゼ（S-AMY とする）活性阻害抗体（抗 S-AMY 抗体）を用いて S-AMY 活性をブロックした後、JSCC アミラーゼ測定勧告法で P-AMY 活性を測定することができた。

3）標準物質はヒト膵型アミラーゼを原料とすることができた。

（13）血清 C-反応性蛋白

1）ヒト C-反応性蛋白質（CRP；C-reactive protein）遺伝子を *E. coli* に組み込み、リコンビナント・ヒト CRP（rCRP）を作製、精製により高純度の rCRP を得た。

2）これを用いて、ヒト CRP 実用標準物質および常用標準物質のプロトタイプを作製した。

３）ヒト CRP 実用標準物質および常用標準物質の性状規格を設定した。

３．今後の課題

実試料標準物質の研究開発についての今後の課題は以下のごとくである。

（１）国際標準化への対応

１）実試料標準物質について、値付け方法、認証書および取扱説明書が作成でき、かつこれらの文書の英文化が行われ、国際標準化のために JCTLM ノミネーションの準備ができた測定項目の血液ガスおよびイオン化カルシウムについては、次回の Cycle Ⅳの JCTLM ノミネーションを行う。

２）平成 18 年度の研究開発で実試料標準物質の設定をする測定項目のヘモグロビン A1c（HbA1ｃ）、総カルシウム、総マグネシウム、血清鉄、尿素窒素、コリンエスレラーゼ、アルブミンについては、JCTLM へのノミネーションを準備する。

（２）実試料標準物質の試作

平成 18 年度の研究開発で実試料標準物質の試作を予定する測定項目は、グリコアルブミン、インスリン、C-ペプチド、コルチゾール、HDL-コレステロール、LDL-コレステロール、膵型アミラーゼ、血清 C 反応性蛋白である。

２－２－２　実施態勢

１．はじめに

計量法は、計量の基準を定め、適正な計量の実施を確保することにより、経済の発展及び文化の向上に寄与することを目的としており、標準の供給は、こうした目的を達成するための不可欠な要素として位置付けられている。

平成５年には、国家計量標準につながりを持つ計量標準の供給を目的とした計量器等の校正制度（JCSS, Japan Calibration Service System制度）が計量法に導入され、計量器の校正に用いる標準物質が計量法上で明確に位置付けられるとともに、国家標準とのつながりによってその信頼性を対外的に確保する体制が整備された。

この計量法改正以降、産業等に必要な標準ガスや金属標準液を中心として、信頼性の高い標準物質の供給が行われてきたが、近年における企業活動の多様化・国際化、技術進歩の急速な展開・短サイクル化、研究開発の高度化等を背景として、標準物質を取り巻く社会・経済環境や期待される役割も急激に変化したことから、我が国としても、国際的整合を持つ標準物質の供給体制の整備を進めていくことが必要不可欠な急務となった。

近年、ライフサイエンス分野における研究の進展等を背景として、遺伝子操作やタンパク質の分析等、バイオテクノロジー技術の具体的利用に当たって、医療や食料といった分野を中心に、計量標準（標準物質）の整備の必要性が国際的に注目されているCIPM（国際度量衡委員会）においても、2001 年にCCQM（物質量諮問委員会）にバイオアナリシスWG が設置されてDNAの定量のパイロットスタディが開始され、順次、他の項目についてもパイロットスタディの拡張が予定されており、また実行されている。

上記の潮流の中で、臨床化学分野として包括される、人の健康や医療に関する分野においても、測定方法の確立に加え、測定結果に対する科学的（計測学的）な信頼性を付与し、①その使用者（医者等）が安心して活用でき、②個人の長期に渡る検査データの活用による、より的確な予防・医療を可能にし、③全国の複数機関での検査結果に係るデータベースを構築して健康・医療へ更なる貢献をすることを可能にし、④今後発展の期待される健康産業の健全な発展を促し、さらに⑤実際に行われた研究成果が世界で認められようにするため、標準物質の開発、値付け手法の確立が極めて重要な課題として把握されてきた。既に欧州では、臨床検査に関しては測定方法の妥当性のみにとどまらず、測定結果の信頼性（トレーサビリティの確保）を保証することまで求められている。このため、臨床検査結果の信頼性と互換性を確保するために必要な国家計量標準としての標準物質や、トレーサビリティを確保するために必要な標準物質の開発・供給が世界の産業界から強く望まれている。

前述の背景より、2002 年6 月にCIPM（ International Committee of Weights and Measures : 国際度量衡委員会物質量諮問委員会）とIFCC、ILAC及びWHOが共同でJCTLM（Joint Committee on Traceability in Laboratory Medicine）を発足させ、臨床検査薬（体外診断薬）・検査機器のためのトレーサビリティの確立に向けた高純度標準物質と実用標準物質に値付けを行う機関のデータベース化を進めている。JCTLM は、①医療計量トレーサビリティの確立、②国立標準研究所と臨床医療研究所との連携強化、③医療計量トレーサビリティ概念の啓発、④認証標準物質・計測方法などの開発、⑤標準測定システムを開発するIVD（体外診断検査）企業の育成、を目的としている。

臨床検査の分野において、これは、①国際的な「トレーサビリティを確立」し、②臨床検査結果の「信頼性と互換性を確保」する、という２大目的にまとめられることから、実際上、２つのWG（ワーキング・グループ）によって組織が構成されることとなった。そのうちのWG１（Quality management in the Clinical laboratory）では標準物質と基準測定操作法の検討を、WG２（Reference system）では実用標準物質に値付けを行う機関の認定についての検討と、そのネットワーク化についての検討を行っており、ライフサイエンス分野全般における計量標準の開発・整備に向けた国際的な動きが活性化しはじめている。よって、我が国の企業が供給している臨床検査薬・検査機器の信頼性の保証、人の健康管理や病気の診断にとって重要な検査項目に必要となる計量標準についても、開発・整備することが急がれている。

特定非営利活動法人・日本臨床検査標準協議会（Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards：JCCLS）は、我が国における臨床検査の向上、発展をめざし、臨床検査の標準設定のための協議、検討並びに提案を行うために、厚生労働省、経済産業省、（社）日本臨床検査薬協会等の学協会、その他関連学協会、国立研究機関などを構成員として、設立された（注）。JCCLSの標準物質製造・頒布に対する基本的な理念と方針は、①臨床検査データの各施設間での互換性を確保し、②共通の臨床判断ができるような標準化作業を推進し、かつ③関連学協会からの標準化に関する情報を集約し、④早急に必要な標準物質の設定作業を行うこと、とされており、また中・長期的な将来戦略としては、①標準化基本検討委員会を設け、②臨床に必須な測定項目を選択し、③標準物質の設定作業を加速させ、④臨床検査データベース化の布石とする、という内容を掲げている。そのため、上記計量標準についても 2005 年 11 月より EG を発足させ、その活動を開始した。

注：JCCLS は、1967 年に設立された米国の NCCLS（米国臨床検査標準委員会、2005 年 1 月より Clinical and Laboratory Standards Institute と改名）や ECCLS（欧州臨床検査標準委員会）などの動向も踏まえ、日本における臨床検査の標準化と質的改善を目的として、1985 年 8 月 27 日に、発起学会４団体を含む 14 学会と 8 協会団体が加盟し､任意団体として発足したもの｡その後 JCCLS の活動が質的、量的にも拡大、変貌を遂げ、臨床検査コミュニティにおけるアイデンティティが高まるにつれ、最早、従来の任意団体に留まっていることが許されず、社会的任務と責任を有する法人格を取得することの必要性が痛感され、今後の JCCLS 活動に相応しい NPO 法人格（特定非営利活動法人）の取得が準備された。2005 年 4 月 20 日付けで所管する東京都から NP0 法人設立認証書が交付され、続いて 5 月 19 日に設立登記が完了した。

２．実施態勢

実試料系標準物質の研究開発にあたっては、表１のごとくの実施態勢をとった。すなわち学協会の専門委員会での作業と連携して行う方法と、標準化基本検討委員会の中に検討のためのワーキンググループ（WG）を設置して行う方法である。

このうち血液ガスとイオン化カルシムは日本臨床化学会（JSCC）の血液ガス・電解質専門委員会、グルコース、尿酸およびクレアチニンは同会の酵素・試薬専門委員会、グリコアルブミン（GA）は同会の糖尿病関連指標専門委員会グリコアルブミン（GA）プロジェクト、血清 C 反応性蛋白（CRP）は同会の酵素・試薬専門委員会 CRP 標準物質作製プロジェクトとそれぞれ連携して行った。

また、コリンエステラーゼ、ヘモグロビン A1c(HbA1c)および血清前立腺特異抗原（PSA）は、日本臨床検査標準協議会（JCCLS）の標準物質小委員会との連携して行った。

標準化基本検討委員会を設置し、検討のための WG を組織した測定項目は、インスリン、C-ペプチド、コルチゾール、HDL-コレステロール、LDL-コレステロール、アルブミンおよび膵型アミラーゼである。

実試料標準物質のプロトタイプの調整あるいは作製については、有限責任中間法人 HECTEF スタンダードレファレンスセンター、旭化成ファーマ㈱、シスメックス㈱およびオリエンタル酵母工業㈱の協力を得た。

表1　実施態勢

項目名	学協会		標準化基本検討委員会		実試料標準物質の
	専門委員会	委員長	検討ﾜｰｷﾝｸﾞｸﾞﾙｰﾌﾟ	委員長	調整あるいは作製
血液ガス	日本臨床化学会				HECTEF スタンダード
	血液ガス・電解質専門委員会	桑　克彦			レファレンスセンター
グルコース	日本臨床化学会				HECTEF スタンダード
	酵素・試薬専門委員会	美崎　英生			レファレンスセンター
尿酸	日本臨床化学会				HECTEF スタンダード
	酵素・試薬専門委員会	美崎　英生			レファレンスセンター
クレアチニン	日本臨床化学会				HECTEF スタンダード
	酵素・試薬専門委員会	美崎　英生			レファレンスセンター
コリンエステラーゼ	日本臨床検査標準協議会				旭化成ファーマ㈱
	標準物質小委員会	桑　克彦			
グリコアルブミン	日本臨床化学会				HECTEF スタンダード
	糖尿病関連指標専門委員会				レファレンスセンター
	GAプロジェクト	武井　泉			
イオン化カルシウム	日本臨床化学会				HECTEF スタンダード
	血液ガス・電解質専門委員会	桑　克彦			レファレンスセンター
ヘモグロビンA1C	日本臨床検査標準協議会				HECTEF スタンダード
	標準物質小委員会	桑　克彦			レファレンスセンター
インスリン、C-ペプチド、			J2WG(産業技術総合研究	千葉　光一	HECTEF スタンダード
コルチゾール			所、日本糖尿病学会、	桑　克彦	レファレンスセンター
			日本臨床検査薬協会)		
HDL-コレステロール、			J1WG(日本臨床化学会、	櫻林　郁乃介	HECTEF スタンダード
LDL-コレステロール			日本臨床検査薬協会)		レファレンスセンター
アルブミン	日本臨床化学会		産業技術総合研究所、	千葉　光一	シスメックス㈱
	酵素・試薬専門委員会	美崎　英生	日本臨床化学会		HECTEF スタンダード
					レファレンスセンター
膵型アミラーゼ	日本臨床化学会		産業技術総合研究所、	千葉　光一	旭化成ファーマ㈱
	酵素・試薬専門委員会		日本臨床化学会		
	P-AMYプロジェクト	白井　秀明			
血清C反応性蛋白(CRP)	日本臨床化学会				オリエンタル酵母工業㈱
	酵素・試薬専門委員会				
	CRPプロジェクト	藤田　孝			
血清前立腺特異抗原	日本臨床検査標準協議会				
(PSA)	PSA検査標準化委員会	加野象次郎			

２－２－３　各論

２－２－３－１　血液ガス

（本報告は、標準物質作製のための文書として作成されたものであり、かつ国際標準化のためにJCTLM ノミネーション用の邦文原稿としたものである。）

１．序文

血液ガス（pH，pCO_2，pO_2）の測定は、救命救急検査として臨床上の重要な分野である。これらの測定に電極法による血液ガス測定装置が用いられるようになって以来、測定の簡便性，迅速性が急速に進歩した。

血液ガス測定装置では全血を希釈することなく pH，pCO_2，pO_2 の各電極膜に直接接触させて測定するために、全血成分によるマトリックス効果や電極膜の汚染劣化による経時変動等から生じる測定値の誤差の問題が避けられない。この誤差を検証する際に必要となる精確さの基盤は、化学分析の合理性に基づいて国際臨床化学連合（IFCC）が規定した「血液 pH 測定用の実用基準法」と「血液 pCO_2，pO_2 測定用標準トノメトリーの実用基準法」である。しかし、これらの実用基準法を各施設で実施するには、専用の装置と技術、加えて多大な時間を要することから、精確さを伝達できる機能を備えた簡便に使用できる実試料標準物質が望まれていた。

通常用いられている精度管理用のコントロールは水溶性の緩衝溶液などであることから、全血が電極に与えるようなマトリックス効果は再現出来ず精確さを検証するための標準物質として使用することは出来ない。また、全血の安定性は氷冷条件で２時間が限界（凍結すると溶血するために冷凍保存ができない）で保存安定性に欠けるため、各施設で共通して使用できる実試料標準物質として実用化することは困難である。そこで、血液と同様なマトリックス効果を持ち、電極に対する挙動および性状は､平均的な全血に一致または近似する動物由来の Hb 溶液を材料とし、安定性を有するものを血液ガス測定用常用標準物質の材料とし、その表示値は IFCC の実用基準法に基づくものとした。表示値のトレーサビリティについては、pH は NIST SRM186 りん酸塩を一次標準物質とし、IFCC の血液 pH 測定実用基準法で測定し、pCO_2 及び pO_2 は JCSS の基準標準ガスを一次標準物質とし、血液 pCO_2，pO_2 測定用標準トノメトリーを実用基準法とする体系によった（図１，図２）。

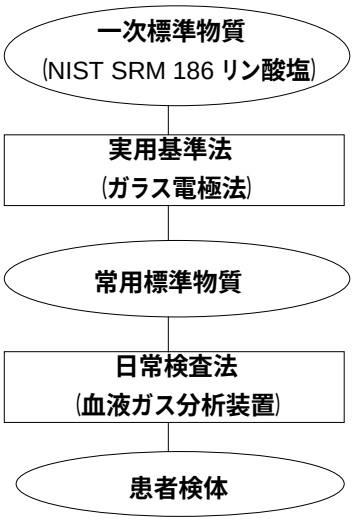


図１　血液 pH の測定体系

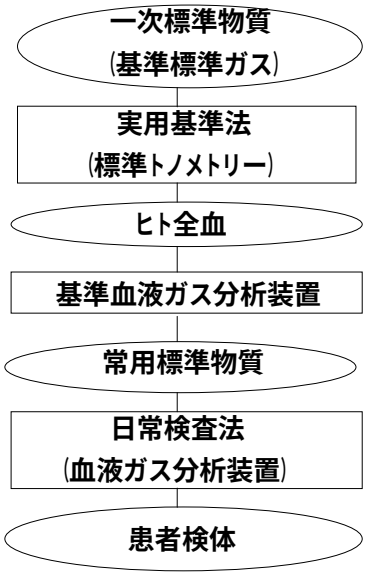


図２　血液 pCO_2 及び pO_2 の測定体系

２．用語の意味

本文書で用いる主な用語の意味は、日本臨床化学会標準品情報専門委員会による「標準に関する用語 Ver.2.4, 1996-02-15」[1)] によるほか、次の通りとする。

（１）pH

pH は水素イオンの相対モル活量 a_{m,H^+}の逆常用対数で定義される。

$$pH = -\log(a_{m,H^+})$$

単位：無次元

（２）pCO_2

pCO_2 は気液平衡状態での液相中及び気相中(液相中あるいは気相中)の二酸化炭素ガス分圧。

単位：kPa　　（1 kPa = 7.5 mmHg）

（３）pO_2

pO_2 は気液平衡状態での液相中及び／又は気相中の酸素ガス分圧。

単位：kPa　　（1 kPa = 7.5 mmHg）

（４）基準標準ガス

血液ガス測定に用いる基準標準ガスは、成分ガス（二酸化炭素または酸素）および希釈ガス（窒素）の高純度ガス二次標準（純度 99.95 %以上）を用い、計量法で定めた標準ガスの指定校正機関あるいは認定事業者が質量比法により調整し、組成および濃度を確保した混合ガス。

（５） トノメトリー

トノメトリーは、液体試料を温度、気圧が一定の条件下で既知組成のガスを用いて気液平衡させることにより既知ガス分圧の液体試料を得る操作。トノメーターはトノメトリーするための装置。

（６） 標準トノメトリー

標準トノメトリーは、血液試料を温度 37℃に保ち、一定の大気圧下で既知組成の基準標準ガスを用いて気液平衡させることにより既知ガス分圧の血液試料を得る操作。

（７） 血液ガス測定の実用基準法

IFCC で定めた実用基準法で、pH についてはレファレンスセルシステムを用いる pH ガラス電極法により測定し、pCO_2 及び pO_2 については標準トノメトリー法により実施する。

（８）二次実試料標準物質

標準トノメトリーしたヒト新鮮全血（酸素を消費して二酸化炭素を生成する白血球と血小板を除いたもの）が血液ガス測定用の二次実試料標準物質となる。この標準トノメトリーした新鮮全血を、直ちに IFCC の実用基準法と血液ガス測定装置で同時に測定することにより精確さの評価ができる。しかし、実用基準法を整備して精確さを維持して実施することは必ずしも容易ではない。また、全血の安定性は氷冷条件で２時間が限界（凍結すると溶血するために冷凍保存ができない）で保存安定性に欠けるため、各施設で共通して使用できる実試料標準物質として実用化することは困難である。

３．常用標準物質の規格

常用標準物質の電極応答性をヒト全血のそれと一致させるためにイオン強度、Base Excess(BE)、総 Hb 濃度等の性状を表１のごとくとする。

表１ 血液ガス測定用常用標準物質の性状規格

項　　目	常用標準物質	平均的全血	測 定 方 法
イオン強度 (mmol／kg)	160±20	160	電解質濃度より算出
Base Excess (mmol／l)	0±4	0	ノモグラム法
総 Hb 濃度 (g／l)	140±20	150	ICSH 法
メト Hb 含量比	6%以下	3%以下	Van Assendelft 法

４．常用標準物質の作製

血液ガス測定用常用標準物質の作製操作手順を図３に示す。

生理食塩水で洗浄した新鮮なウシ又はウマ赤血球を約等容量の水で溶血処理し、血球膜をろ過又は遠心分離により除去する。次いで、塩化ナトリウム，炭酸水素ナトリウム、水を適量ずつ加え、イオン強度、重炭酸濃度、BE（Base Excess)、総 Hb 濃度が表１の性状規格内となるように調製する。

二酸化炭素、酸素、窒素を用いてこの Hb 溶液の pH，pCO_2，pO_2 を調節した後、非通気性の袋に密封して、20℃付近に設定した恒温水槽内に入れる。この状態でガス平衡に保たれた Hb 溶液を、酸素、二酸化炭素及び窒素から成る混合ガスでパージしながらガラスアンプルに一定量ずつ分注後直ちに溶封し、これを速やかに－70 ℃以下のフリーザーに移し凍結保管する。充填する前の Hb 溶液の pH，pCO_2，pO_2 及びガラスアンプルのパージに用いる混合ガス組成を変えて、ガス分圧レベルの異なった標準物質を作製する。

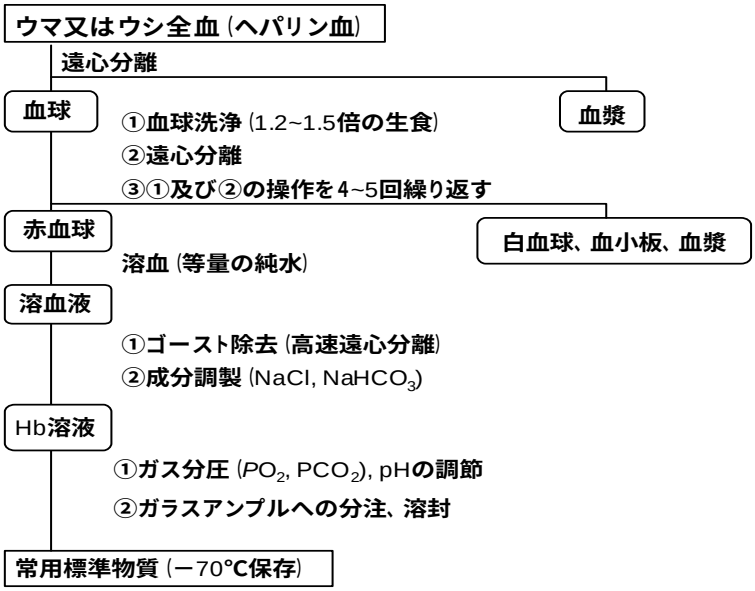


図３　常用標準物質の作製操作手順

５．認証値の測定方法

常用標準物質の認証値は、IFCC で定めた血液ガス測定の実用基準法を基にして値付けする。

（１）　pH の測定

測定には毛細管型 pH ガラス電極、毛細管型自由拡散型液絡、飽和 KCl 塩橋溶液、比較電極で構成される表２の規格を満たす血液 pH 測定用レファレンスセルシステムを用いる。システム全体は、図４のごとく 37±0.2 ℃の恒温水で充たされ、37 ℃下での正確な pH が測定できるように構成されている。

システムの校正は、以下の手順で調製した pH 標準液を用いて行う。

１）pH 6.840 標準液

3.404g の NIST SRM 186‐Ⅰ‐f (KH_2PO_4)と 3.551g の NIST SRM 186‐Ⅱ‐f (Na_2HPO_4)を精秤して、二酸化炭素を除去した電気伝導度 2 μS/cm 以下の水に溶解して全重量を 1000.0 g としたもの。

２）pH 7.392 標準液

1.184g の NIST SRM 186‐Ⅰ‐f (KH_2PO_4)と 4.322g の NIST SRM 186‐Ⅱ-f (Na_2HPO_4)を精秤して、二酸化炭素を除去した電気伝導度 μS/cm 以下の水に溶解して全重量を 1000.0 g としたもの。

図４のシステムを１）、２）の pH 標準液を用いて校正した後、次の手順で常用標準物質を測定する。まず、常用標準物質が入ったアンプルを 30±0.2℃の恒温水槽中に 10～30 分間浸す。次にアンプルを水槽中で十分に振り、アンプル内の Hb 溶液を完全に気液平衡状態にする。アンプルを開封し、直ちに試料をシステムのガラス電極部に導入して pH を測定する。日内及び日間の繰り返し測定を行い認証値を決定する。

表２　pH レファレンスセルシステムの性能規格

pH 電極	毛細管型ガラス電極（直径 0.3～0.6mm）又はバルブ型ガラス電極
液絡部	毛細管自由拡散型（直径 0.4 mm 以下）の液／液ジャンクションタイプ
塩橋溶液	飽和 KCl
分解能	0.001 pH 以上
応答時間	15 秒以内（95%応答）
直線性	pH あたりの起電力の理論値からのずれが 2%以内
ドリフト	0.001 pH／hr 以下
繰り返し精度	SD=0.002 pH 以下 (n=5)
ナトリウム誤差	0.003 pH 以下
試料量	500 μl 以下
恒温水槽温度	37.0 ± 0.05℃

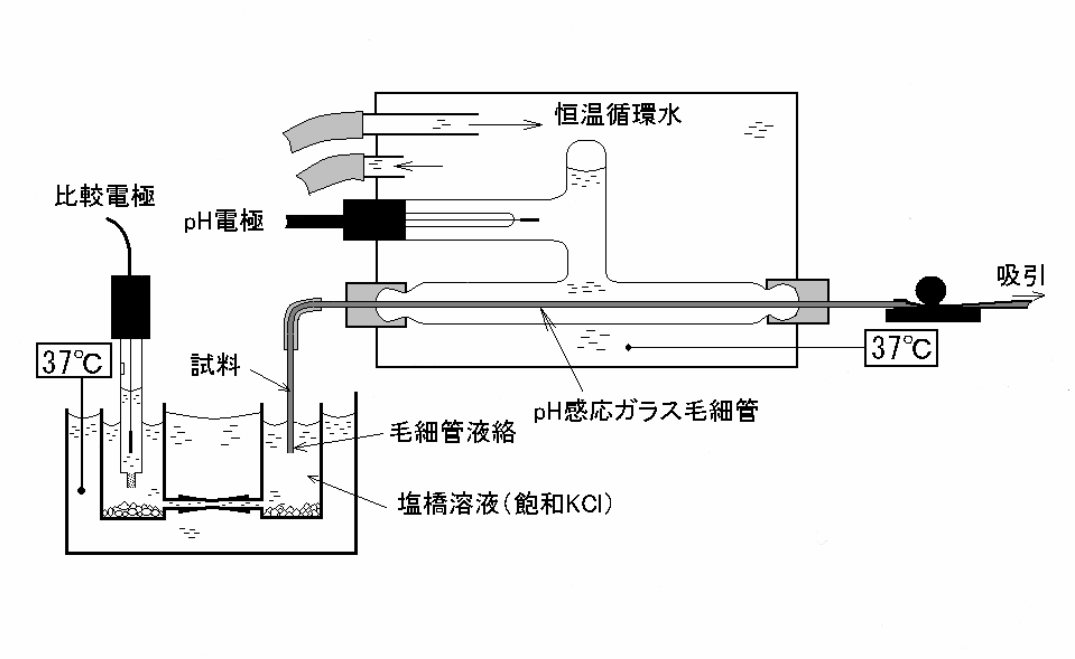


図４　血液 pH 測定用レファレンスセルシステムの構成

（２）pCO_2 及び pO_2 の測定

測定には表３の規格を満たす標準トノメトリーシステムと表４の仕様を有する基準血液ガス分析装置を用いる。標準トノメトリーシステムの一例を図５に示す。基準血液ガス分析装置には、同一の基準標準ガスで標準トノメトリーした新鮮ヒト全血と常用標準物質の材料である Hb 溶液を測定したとき、各々の測定値の差は 1%以下である装置を選定する。

まず、３レベル以上の基準標準ガスを用いて標準トノメトリーし、それを測定して血液ガス測定装置を校正する。この常用標準物質の pCO_2 及び pO_2 は次式によって求める。

$pCO_2 = (P_B - P_{H_2O}) \cdot X_{CO_2}$

$pO_2 = (P_B - P_{H_2O}) \cdot X_{O_2}$

P_B：測定時の大気圧

P_{H_2O} : 37 における飽和水蒸気圧 6.28kPa（47.1mmHg）

X_{CO_2}，X_{O_2}：基準標準ガス中の CO_2，O_2 各々の重量モル分率

次に、pH の測定の場合と同様にして 30±0.2 ℃の恒温水槽中で完全に気液平衡状態にした常用標準物質を測定する。日内及び日間の繰り返し測定により認証値を決定する。

表３　標準トノメトリーシステムの規格

トノメーター	薄膜式トノメーター（IL 232 型：IL 社製を推奨）
試料量	2 ml 以下
平衡化時間	20 分以内（全血試料）
加湿器	全血を 20 分間トノメトリーした時の Hb 濃度の変化が 1 %以下
基準標準ガス	含量の拡張不確かさが 0.4 %以下
ガス流量	300～500 ml/min
恒温水槽温度	37.0 ± 0.1℃

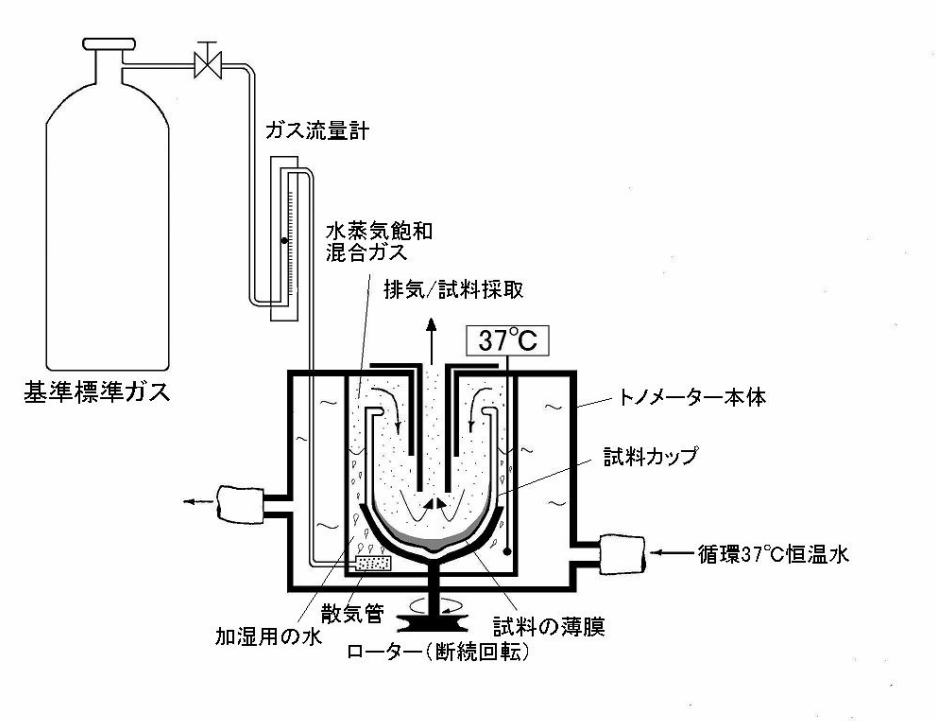


図５ 標準トノメトリーシステムの構成

表 4 常用標準物質の値付けに使用する基準血液ガス分析装置の仕様

分 解 能	0.01 kPa (0.1 mmHg)
応答時間	60 秒以内（99 %応答時間）
ドリフト	0.0 4kPa (0.3 mmHg)／hr 以下
繰り返し精度	標準偏差(SD)=0.04kPa (0.3 mmHg)以下 ,n=5
一 致 性 の	同一条件で標準トノメトリーしたヒト全血とヘモグロビン溶液 各々の測定値の差は 1%以内
試 料 量	500 µl 以下
測定電極部温度	37.0 ± 0.2 ℃

６．表示値及び不確かさ

今回調製した標準物質について、前述の測定方法により測定して得られた値とその不確かさを以下に示す。

■表示値及び不確かさ

ガス平衡温度（30℃）

Lot No.	ラベル	pO_2(mmHg)	pCO_2(mmHg)	pH
B03-1	(青)	44.4±2.5	66.0±3.0	7.275±0.030
B03-2	(緑)	85.6±3.0	47.5±2.5	7.376±0.030
B03-3	(赤)	142.4±4.0	28.8±2.0	7.534±0.030

表示値はいずれも測定温度 37 ℃の値である。

不確かさは、一次標準物質の標準不確かさと、国内で上市されている７桟種の血液ガス測定装置の測定値の標準不確かさを合成し、それに 2 をかけて拡張不確かさを求め、それを上記不確かさとした。

７．性状の評価

（１）均一性及び安定性

１）均一性

同一ロットとして作製した常用標準物質（N=1,000 本）を充填順に３区分に分け、各々の区分から５本を無作為に抜き取り、合計 15 本のアンプルを基準測定装置で測定して均一性を評価した。その結果、アンプル間差は相対標準偏差として pH で 0.005 以内、pCO_2 及び pO_2 で 1%以内であることが確認され均一性に問題はなかった。

２）保存安定性

保存安定性を pH で 0.01 以上、pCO_2 及び pO_2 で 2%以上の変化が生じない保存期間で表すと、凍結保存温度が－70℃以下では３年間変化がみられなかったが、－40℃以上の凍結状態では約 1 ヶ月であった。従って、常用標準物質を長期間保管するには－70℃以下で凍結しなければならない。

輸送、保管等の都合で冷蔵状態にしておく場合の保存安定性は、５日間である（図６）。冷蔵での保存期間は、原料の耐酸化性に依存しメトヘモグロビンの生成が速いものは保存期間が短い傾向がみられた。常用標準物質の保管に際しては、ロット毎に表示されている有効期限を十分に確認して取り扱うことが重要である。

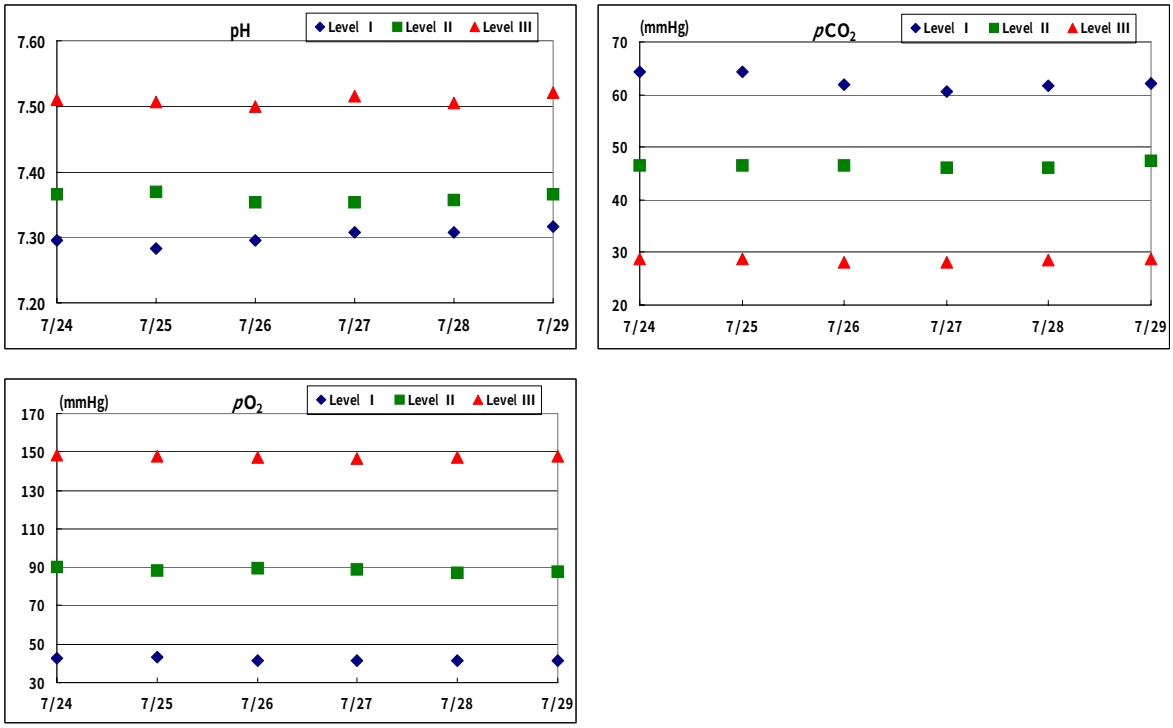


図６　保存安定性（冷蔵保存）

（２）酸素解離特性

常用標準物質に用いる Hb 溶液の酸素解離曲線（ただし、縦軸は酸素含量(ml/l)を示す）は、図７に示すように市販の精度管理物質に用いられている材料に較べて良く全血に一致しており、酸素電極に対する応答性についても全血との一致性が得られ易い。

注）さらに酸素親和性を全血と類似させるためのアロステリックエフェクターとしてイノシトール六リン酸を添加することも可能である。しかし市販多項目複合機の一部の機種において、この物質がグルコース電極に悪影響を及ぼすことが確認されたので、その後は添加しない。

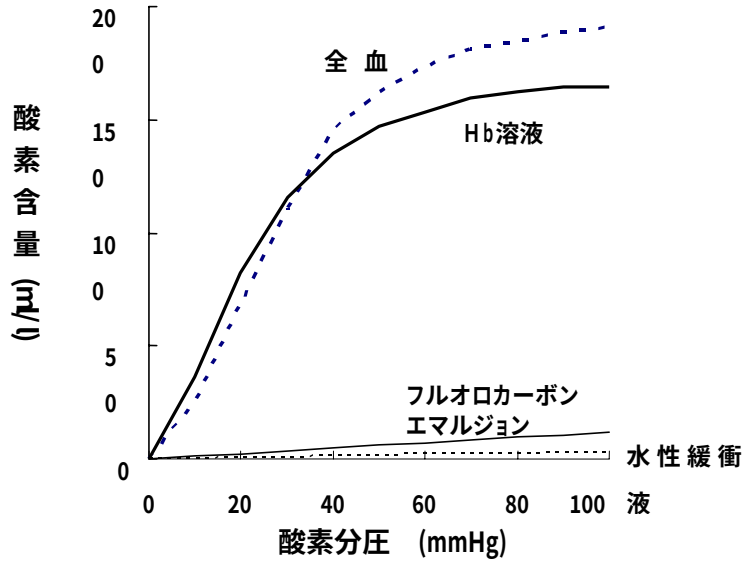


図７　常用標準物質の 0_2 解離曲線の比較

（３）全血との一致性

Hb 溶液とヒト全血との一致性を調べるために、同一の混合ガスを用いてそれぞれを標準トノメトリーして市販の測定装置（３社の７機種）で測定した。その結果を図８に示した。pCO_2，pO_2 共に全機種でほぼ良い一致性がみられ、Hb 溶液がヒト全血の代用になることが判る。

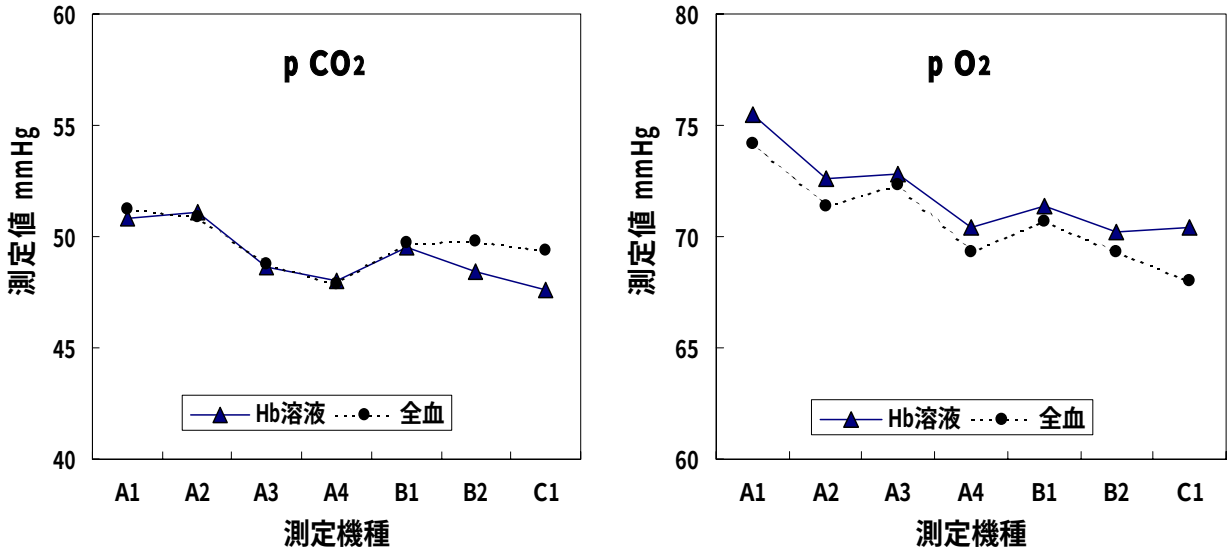


図８　Hb 溶液と全血試料との一致性

（4）常用標準物質を用いた血液ガス測定装置の精確さの確認例

石川･富山･福井の北陸 3 県の臨床衛生検査技師会では、1996 年より血液ガス測定用常用標準物質を用いた EQA を毎年実施している。EQA に使用した試料は、血液ガス測定用常用標準物質と同様の手法で EQA 用に調整されたものであり、 1 セットが 3 濃度（レベルⅠ～Ⅲ）からなり、1 施設につき 2 セットを配布した。試料の輸送は、各施設まではドライアイスによる冷凍状態(－40℃以下)で、施設到着後は 4～6℃の冷蔵状態で保存した。試料到着後 3 日以内に使用説明書の指示に従い測定した。

図 9 に 1996 年から 2003 年までの全参加施設の各測定項目における測定値の変動係数の平均値の年度別推移を示した。1996 年は各項目とも大きなばらつきを示したが、1997 年以降は安定に測定されている。

表 6 は 2003 年に実施した EQA の標準物質の表示値と参加 137 台の測定結果および表示値の範囲内に入った数を示した(ここで、表示値の範囲は測定結果の収束の度合いをみるため便宜的に用いた)。表 6 からも分かるように pHに関しては、各レベルとも約 90%以上が表示値の範囲内に入っており、EQA 参加機種の殆どが pHを精確に測定していることが分かった。

pCO_2 については、表示値の範囲に入った割合がレベルⅠ,Ⅱで 80%以上と高かったが、レベルⅢでは、71.5%であった。また、pO_2 についてはレベルⅠ,Ⅱで約 50%と低かったが、レベルⅢでは 75.9%と若干高かった。

血液ガス測定用常用標準物質（3 濃度）は各施設に 2 セットづつ配布されているので、最初のセットの結果を用いて補正式を作成し、2 セット目の結果の補正を試みた。図 10,11 および 12 はそれぞれ、pH, pCO_2, pO_2 の補正前後の分布を示したものである。(縦線は表示値とその範囲を示す)。各項目の分布は補正前（Set2）では幅広く分布しており 2 峰性を示す場合もあった。これは機種間差やメーカー間差が反映された結果であり、補正後はほぼ世紀分布に近い分布を示し、モード値も表示値の中心とよく一致していた。このことは表示値の範囲内に入る割合（口内の→の前後の数値）が補正後に飛躍的に高くなることからも分かる。

以上のことからこの血液ガス測定用常用標準物質は、ヒト全血と類似の性状であるので、実試料でも同様の結果が着たいできること、血液ガス測定用常用標準物質による EQA は、血液ガスデータの標準化を実践する上で非常に有用性は高いと考えられる。

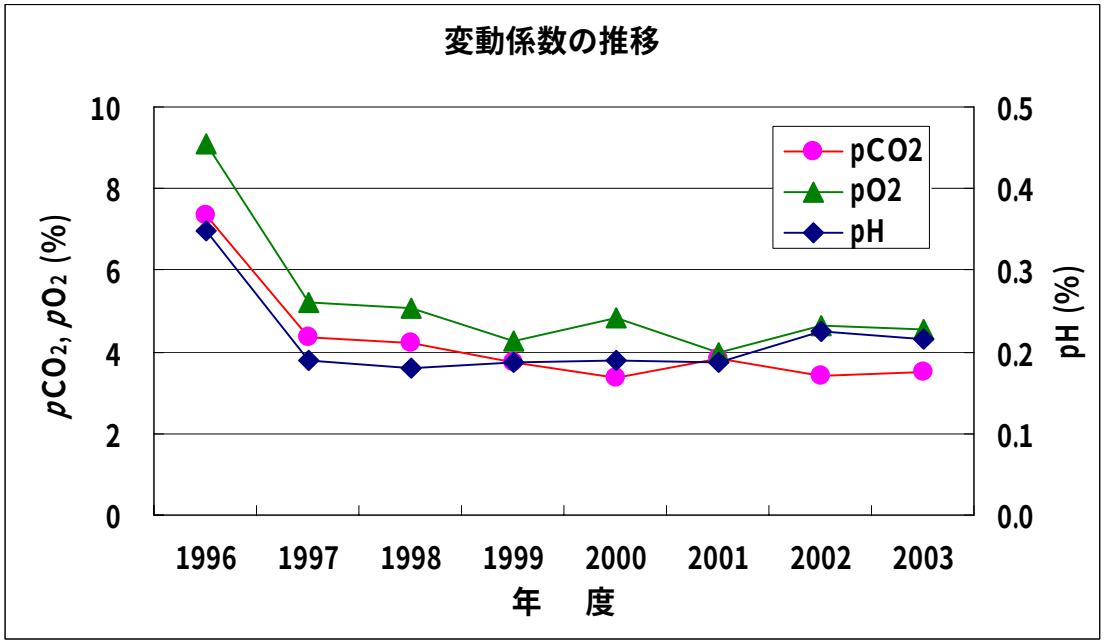


図９　測定値のばらつきの年度別推移（変動係数）

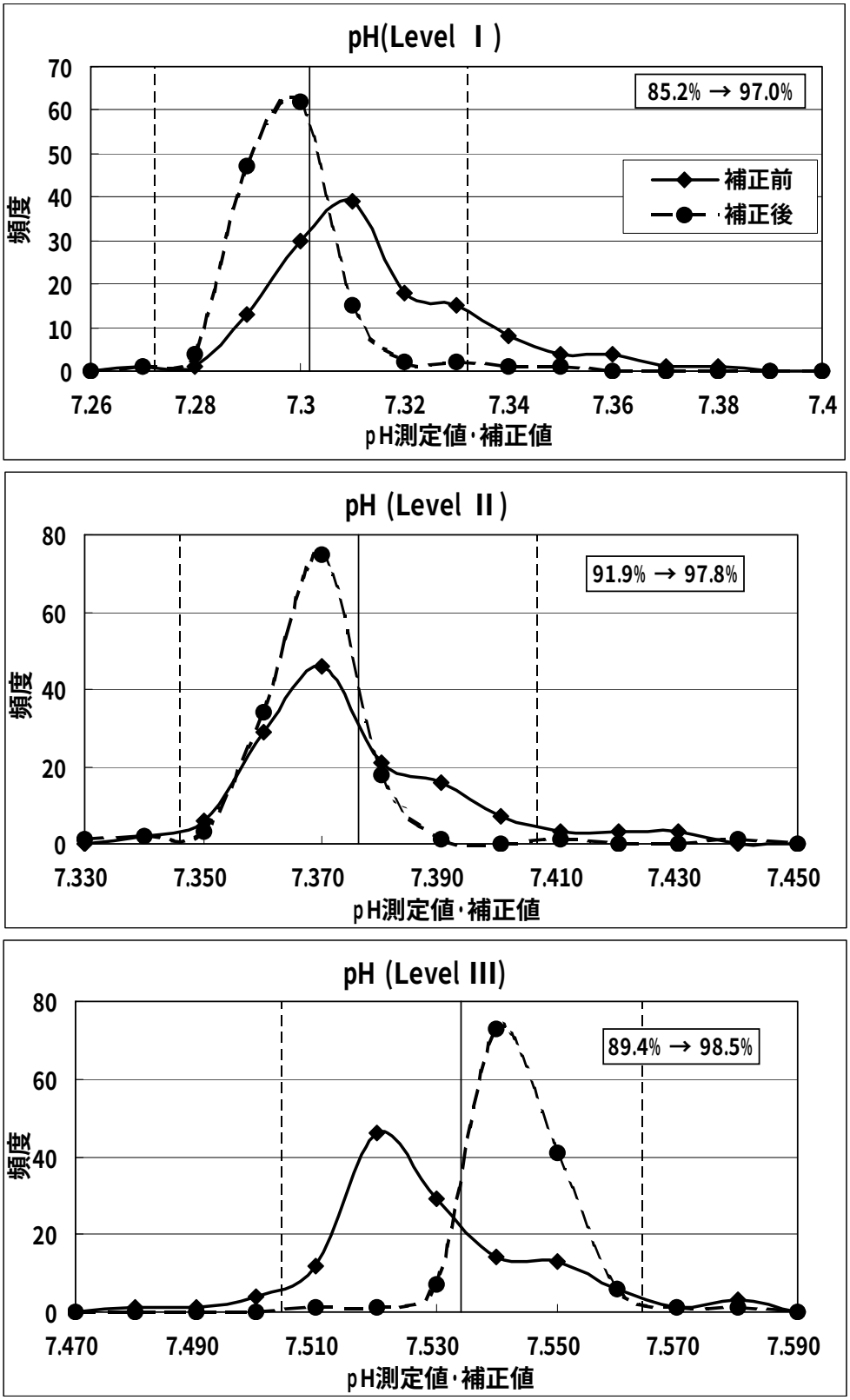


図 10　測定値および補正値の分布(pH)

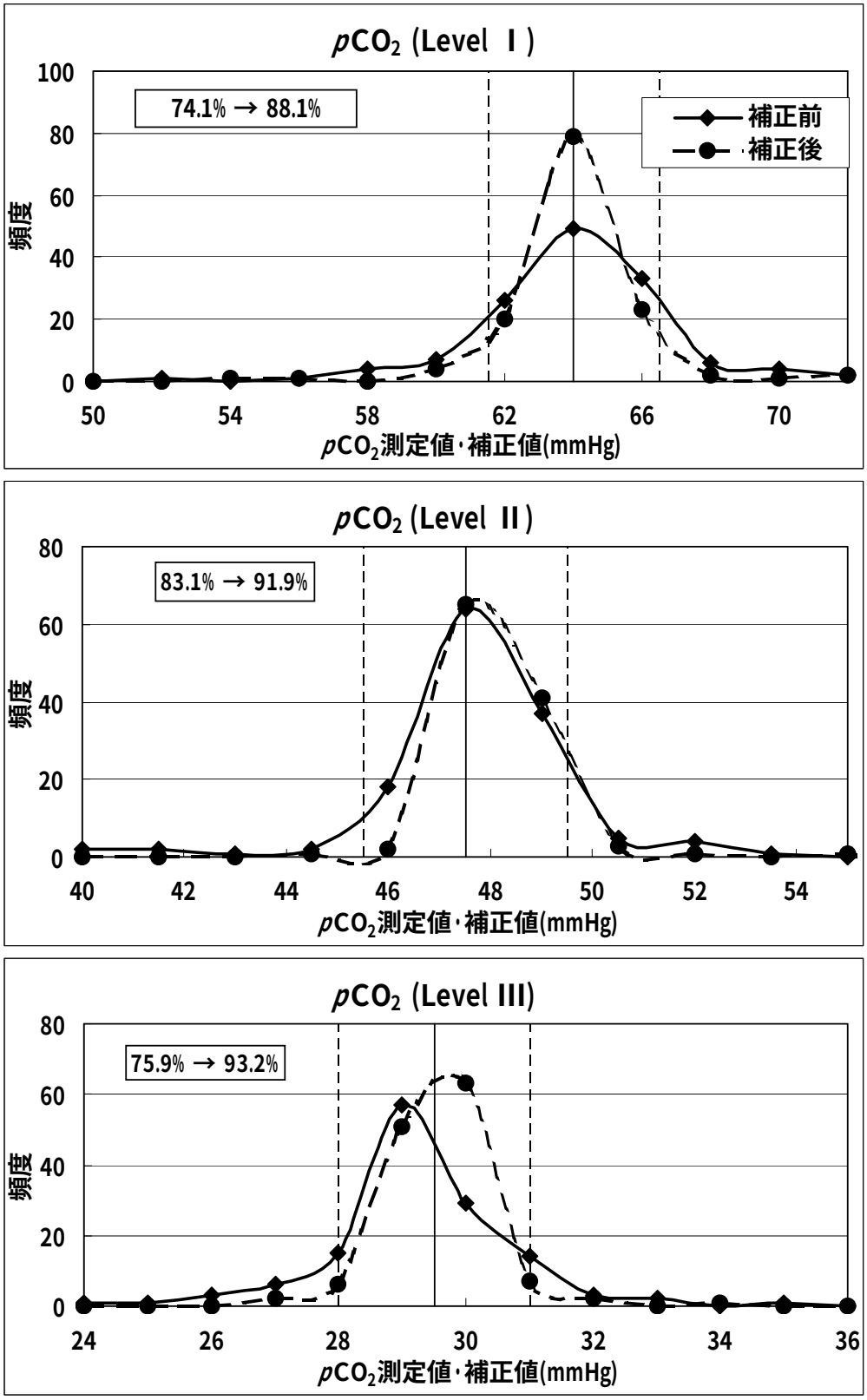


図 11　測定値および補正値の分布(pCO_2)

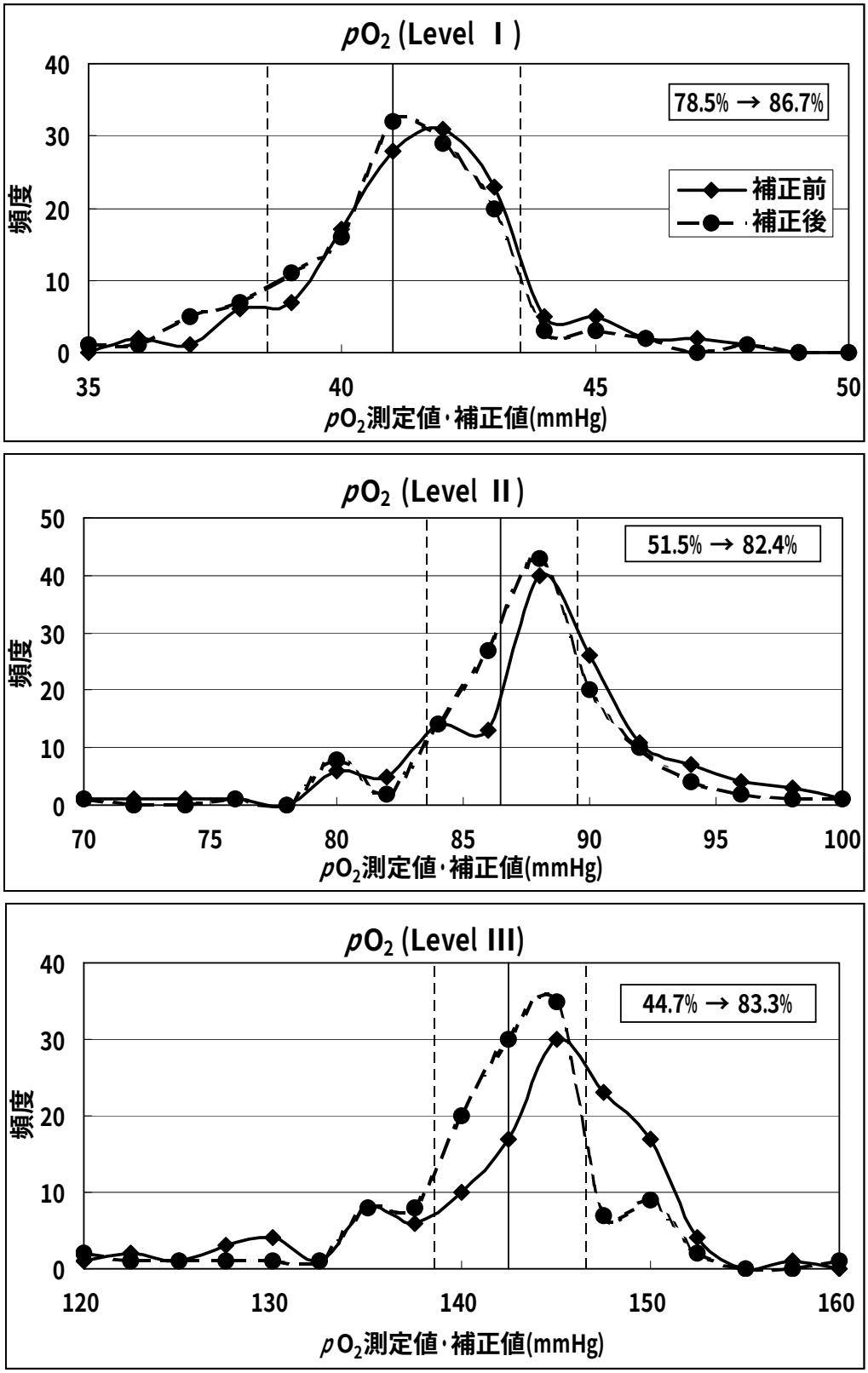


図 12　測定値および補正値の分布(pO_2)

表 6　試料の表示値・測定値

項目	レベル	表示値	測定結果	バイアス	表示値内に入った数
pH	Ⅰ	7.302±0.03	7.3078±0.01657	0.0058	123/137 (89.8%)
	Ⅱ	7.376±0.03	7.3702±0.01517	-0.0058	130/137 (94.9%)
	Ⅲ	7.534±0.03	7.5238±0.01606	-0.0102	123/137 (89.8%)
pCO_2 (mmHg)	Ⅰ	63.0±2.5	63.17±2.47	-1.83	98/137 (71.5%)
	Ⅱ	47.5±2.0	47.20±1.31	-0.30	115/137 (83.9%)
	Ⅲ	29.0±1.5	28.96±1.13	-0.04	116/137 (84.7%)
pO_2 (mmHg)	Ⅰ	41.0±2.5	41.03±2.06	0.03	104/137 (75.9%)
	Ⅱ	85.5±3.0	87.16±3.65	1.66	73/137 (53.3%)
	Ⅲ	142.5±4.0	142.69±6.294	0.19	66/137 (48.2%)

■文献

1）日本臨床化学会標準品情報専門委員会：標準に関する用語(Ver. 2.4)(1996-02-15). 臨床化学 25:126-134, 1996

2）Approved IFCC methods. Reference method(1986) for pH measurement in blood. *Clin Chim Acta* 165:97-109, 1987

3）IFCC Method(1988) for tonometry of blood : Reference materials for P_{CO2} and $\underline{P}_{O2}$. *J Clin Chem Clin* Biochem 27:403-408, 1989

4）Mahony JJ, Wong RJ, Kessel ALV : Reduced bovine hemoglobin solution evaluated for use as a blood gas quality-control material. *Clin Chem* 39: 874-879, 1993

5）ISO TAG4:Guide to the expression of uncertainty in measurement(GUM), BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, OIML, 訂正版, 1995

6）福永壽晴：血液ガス測定装置の精確さの評価. 日本臨床検査自動化学会会誌 24:179-184, 1999

7）日本臨床学会、血液ガス・電解質専門委員会：イオン電極法による血液中ナトリウム、カリウム、塩素濃度測定の勧告法―標準血清による正確さの校正方法―. 臨床化学 22：279-290,1993

２－２－３－２　グルコース

（本報告は、標準物質作製のための文書として作成されたものであり、かつ国際標準化のためにJCTLM ノミネーション用の邦文原稿としたものである。）

１．序文

血中のグルコースは生理的に重要なエネルギー源であり、生体中でのグルコースの生成およびその利用はインシュリン、グルカゴン、カテコールアミン、ACTH、成長ホルモンなどのホルモンによって調製されている。この糖代謝は血中遊離脂肪酸あるいは中性脂肪の動態とも密接な関係にあり、組織でのエネルギー代謝を知る上で、血中グルコースは最も重要な指標といえる。

また、現在の糖尿病患者および糖尿病予備群における糖尿病態関連指標の一つとして血中グルコース測定は不可欠な項目の一つとなっている。近年、自己血糖測定器および POCT（Point of Care Testing）装置の普及が著しく、自動分析装置による測定をあわせると、膨大な血糖測定が毎日行われている。この重要な血糖測定のトレーサビリティ体系を確立することは、急務となっており、本研究はその体系において重要な役割を担う標準物質の確立を目標に行われた。

グルコース測定のトレーサビリティ体系においては、純物質としての D-グルコース一次標準物質（凝固点降下熱量分析法により純度を確定）と、血清マトリックスを有し、基準法である同位体希釈質量分析法により値決めされた一次実試料標準物質とが確立され、次に、実用基準法により値決めされ、一次試料標準物質によりトレーサビリティの確認されたグルコース常用標準物質が確立される必要がある。その体系を図１に示す。

本グルコース測定用常用標準物質の表示値は、実用基準法である日本臨床化学会勧告法により値決めすることとした。これは、血清をソモジー法で除タンパク後、グルコースをヘキソキナーゼ及びグルコース－６－リン酸脱水素酵素を用いた反応系により測定する方法であり、同位体希釈質量分析法との相関において良好な結果が得られている。

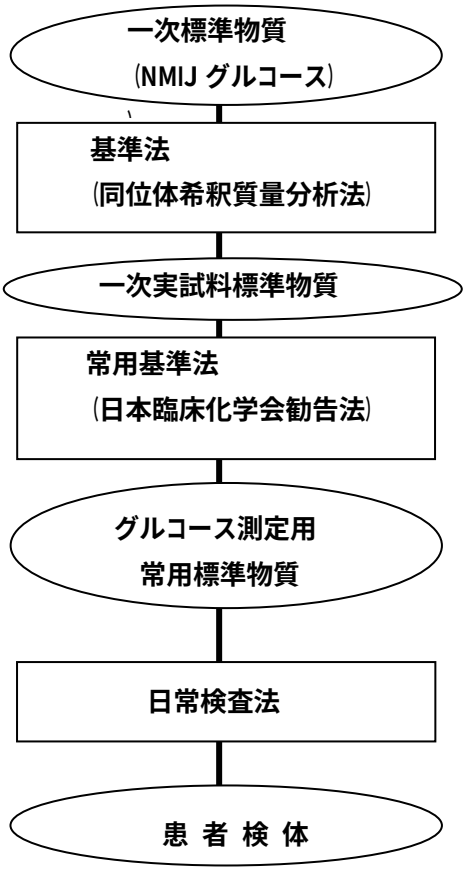


図1　グルコースの測定体系

２．グルコース測定用常用標準物質の規格

調製する試料の仕様を以下に示す。

（１）濃度は 70～280mg/dl の範囲で 3 レベルとし、おおよその濃度範囲は以下の通りとする。

レベル１：70　～100　mg/dl

レベル２：120　～170　mg/dl

レベル３：220　～280　mg/dl

（２）密度　　1.022～1.025g/cm^3 (25℃)とする。

（３）総タンパク、アルブミン、コレステロール、及び中性脂肪については、 いずれも基準範囲内のものとする。

（４）アンモニア性窒素は 0.15　mmol/ dl 以下とする。

（５）アスコルビン酸は 0.2μg/ml 以下とする。

（６）感染性については、原料血清にはＨＢｓ抗原陰性、ＨＣＶ抗体及びＨＩＶ抗体不検出のものとする。

３．グルコース測定用常用標準物質の作製

（１）調製方法について以下に示す。

１）グルコース濃度が 60～100 mg/ dl であることを測定により確認したヒト血清をブレンドしてグルコース濃度 70～100 mg/ dl の範囲内の濃度となる血清を得、ろ過器を用いてろ過後、３分割し、それぞれレベル１，２，３の原料血清とする。

２）レベル１原料血清については、グルコースの添加を行わずに次工程に進む。

３）レベル２原料血清については、グルコース純品を少量ずつ添加し、最後が 120～170mg/dl になるように濃度調節し、均一となるまで混合する。均一になったか否かについては、サンプリングを行い、測定を行って確認する。

４）レベル３原料血清については、グルコース純品を少量ずつ添加し、最終濃度が 220～280mg/dl になるように濃度調節、均一となるまで混合する。均一になったか否かについては、サンプリングを行い、測定を行って確認する。

５）レベル１、２、３の血清を、滅菌ろ過し、次にプラスチックバイアル瓶に分注器を用いて 1ml ずつ分注後、フタを閉め冷凍保管する。

（３）調製にあたっての注意事項

１）プラスチックバイアル瓶については、未開封のものを用いる。

２）グルコース純品は、JISK8824（D-グルコース）に規定する試薬特級（純度 98.0%以上）を用いる。

３）分注器の分注精度は±0.1ml 以下のものを用いる。

４）濃度は、所定の範囲のできるだけ中間となるように調節する。

５）血清ろ過器は、滅菌消毒後十分に洗浄し、クリーンルーム内で風乾したものを用いる。

４．表示値の測定方法

表示値の測定方法は、日本臨床化学会の勧告法であるヘキソキナーゼG-6-ＰＤ酵素法とした。これは、Somogyii 法による除タンパク後、血清上清に測定試薬である酵素液を加えて生成したNADPH による吸光度変化を測定し、検量線から血中グルコース濃度を求めるもので、その操作法を以下に示す。

（１）試薬

１）除タンパク液

①　7mmol/l 硫酸亜鉛溶液

硫酸亜鉛・7 水塩(22g)を、新しく精製した温脱炭酸精製水約 900ml に溶解する。
室温まで冷却後、脱炭酸水を追加し、全量 1000ml とする。施栓して転倒混和し、ガラスまたはポリエチレン瓶に入れ、密栓して室温で保存したもの。

②　飽和水酸化バリウム溶液

水酸化バリウム・8 水塩 80g を新しく調製した温脱炭酸精製水に溶解（完全には溶けない）して、全量 1000ml とする。ソーダライム管をつけて CO_2 の吸収をさけて室温で一夜放置したもの。

③　水酸化バリウム溶液(55mmol/l 相当)

飽和水酸化バリウム溶液 245ml に脱炭酸精製水を加えて、全量 1000ml とし、以下の滴定法によって濃度を調製する。

滴定：77mmol/l 硫酸亜鉛液 10.0ml をフラスコにとり、指示薬として 0.5%フェノールフタレン溶液（95%エタノールで溶解する）２滴を加え、かすかなピンク色を終点とするまで水酸化バリウム溶液を調整する。

２）5mmol/l マグネシウム-0.1mmol/l トリスー塩酸緩衝液（pH7.5）

トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン 12.1g を 1000ml のメスフラスコに入れ、約 500ml の精製水に溶解する。次に 0.2mol/l 塩酸溶液で pH7.5 に調整し、これに 5mmol/l の濃度になるように酢酸マグネシウム・4 水塩 1.07g を加えて溶解後、精製水で 1000ml としたもの。

３）測定用酵素試薬（用時調整）

２）で調整した5mmol/lマグネシウムー0.1mmol/lトリス塩酸緩衝液に次の4試薬を順に溶解後、室温で全量 1000ml としたもの。

・ATP・2Na・$3H_2O$	726mg
・NADP・Na・$4H_2O$	1004mg
・ヘキソキナーゼ	800-1000IU
・G-6-PDH	800-1000IU

４）グルコース標準液の調製法

①　0.1%安息香酸溶液

安息香酸を水に溶かして 1.0g/l の水溶液を調製したもの。

②　1000mg/dl グルコース標準原液

使用前にシリカゲルまたは五酸化リンなどの適当な乾燥剤を入れたデシケータで恒量となるま

で乾燥した NIST SRM917a(D-グルコース)　5,000g を、容量検定された 500ml のメスフラスコに入れ、安息香酸溶液を加えて溶解する。20±1℃の恒温槽にフラスコの首の所まで入れ、時々攪拌して 30 分放置後、0.1％安息香酸溶液で全量 500ml としたもの。ガラスまたはポリエチレン瓶に入れ、密栓して 2-8℃に保存する。6 ヶ月間は安定である。

③　グルコース各種標準液

グルコース標準原液を 0.1％安息香酸溶液で正確に希釈して、50，100，200，300，及び 400mg/dl の５濃度の標準液を調製する。

（２）血液除タンパク操作

10ml の試験管に、55mmol/l 水酸化バリウム溶液を 2.0ml、及び血清 0.2ml を加え、ミキサーで 5 秒間攪拌する。１分以内に 77mmol/l 硫酸亜鉛溶液 2.0ml を加え、激しく 10 秒間混和する。５分間以上放置後、パラフィルムでカバーをし、1000g で 10 分間遠心し、上清を別の試験管に移し、注意して観察する。もし、浮遊物があれば再度遠心する。

（３）測定操作

水（試薬盲検用)、グルコース標準液、除タンパク血清上清液について、それぞれ 1.0ml を別々の試験管にとり、これに測定試薬（酵素液）5.0ml を加えてよく混和後、25±１℃で 10 分間加温する。30 分以内に 340nm で試薬盲検を対照にして測定する。別に、5 濃度レベルのグルコース標準液を測定し、検量線を作成し、検量線から試料濃度を求める。

５．表示値及び不確かさ

今回調製した標準物質について、前述の測定方法により測定して得られた値と
その不確かさを以下に示す。

レベル1	レベル2	レベル3	
73.9 ± 0.5	132.5 ± 0.7	239.0 ± 1.7	mg/dl
4.10 ± 0.03	7.34 ± 0.04	13.25± 0.09	mmol /l

1)不確かさは ISO 指針（GUM：計測における不確かさの表現のガイド）に従って求め、拡張不確かさで表した。拡張不確かさ U は、U＝ku で求められる。ここで u は合成標準不確かさを表わし、k は 95％信頼水準における t 分布から求められる包含係数であり、この場合 k ＝2.3 であった。

2)正確さのトレーサビリティの確保：表示値測定の標準液には、NIST SRM917b D-グルコース（純度 99.7±0.2％）を用いた。表示値の測定における血清試料及び標準液の調製は、計量法校正事業者認定制度に基づく認定事業者により校正された天秤を用いて行った。

６．性状

（１）血清密度及び代表的成分

本常用標準物質の密度及び代表的成分について測定した結果を以下に示す。

項　目	参 考 値	単 位	測 定 方 法
密　度	1.024 (25℃)	g/cm^3	
総タンパク	7.3	g/dl	ビュレット法
アルブミン	4.4	g/dl	BCG 法
アンモニア性窒素	0.16	mg/dl	除タンパク比色法
アスコルビン酸	0.2 以下	μg/ml	比 色 法
総コレステロール	133	mg/dl	酵 素 法
中性脂肪	53	mg/dl	酵 素 法

（２）均質性及び安定性

１）均質性

本常用標準物質は室温で液状であり、分注後は凍結状態で保管される。保管までは液状であるため、物理的には均質のはずである。しかし不十分な混合、容器の汚染、水分の蒸発等により、不測の問題が発生して均質でないことが起こりうる。このことはISOガイド34に特記されている。ガイド34によれば均質性試験におけるサンプリングは、このような例では、系統サンプリングが適するとしてある。そこで、本常用標準物質においては、系統サンプリングを採用することとした。すなわち、分注の最初、中間、及び最後の各グループから、それぞれバイアル容器を５本づつ抜き取り、均質性試験を行った。その結果、最初、中間、最後の各グループの平均値も有意な差（95%信頼区間）は見られず、均質であるといえる。

２）保存安定性

ISOガイド34によれば、安定性試験は十分な均質性が実証された後で実施されなければならない。上記のように均質性については十分といえるので、次に安定性試験を行うこととした。安定性試験は２つに分類される。本常用標準物質は溶解後使用されるが、それが少なくとも常温で１時間は安定であるか否かという溶解後の安定性と、もう１つは保存安定性である。前者については、溶解直後、１時間後、及び、２時間後の試料を同時に精密測定法で測定し、差を比較する方法によった。試料はそれぞれ５本とした。その結果、溶解直後を基準とし、1 時間後及び２時間後の変化を求めたところ、それぞれ相対値で表すと＋0.1%、－0.4%となり、いずれも有意な差は見られなかった。これから、溶解後２時間は安定であることが言える。

次に、保存安定性試験を行った。本常用標準物質は防腐剤を加えてないが、冷凍状態で保管されるので、冷蔵品又は凍結乾燥品と比較して保存安定性に優れている。しかし、グルコースの場合、冷凍であっても保存温度条件によっては長期間の保存中に変化が生じる恐れがある。しかし、経験的に-70 ℃以下で保存すれば長期間安定であることがわかっている。本研究では一歩進めて-20 ℃における安定性を調べた。すなわち、１，２，３ヶ月経過後に 5 本づつを抜き取り、-80 保存のものを対照として比較を行った。その結果を図２に示す。これから、３ヶ月で-1.2%の変化となり、保存安定性は得られなかった。これから、グルコース常用標準血清は-70 ℃以下で保存することとした。

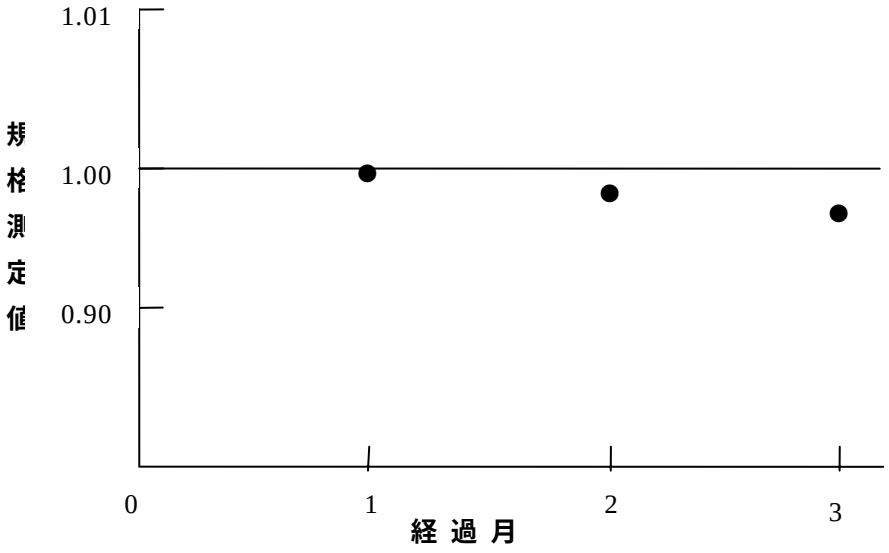


図２　保存安定性結果（スタート時を 1.00 とした）

３）表示値の評価

本常用標準物質のグルコース表示値について、NIST　SRM965a (Glucose in Human Serum)との比較評価試験を行った。比較評価試験方法は、JCTLM のドキュメント JCTLM　WG1　P-04A（Process for Comparing Certified Valued of the same Measurand in Multiple Reference Materials）に従った。この方法の概要を以下に示す。

評価しようとする標準物質と、比較のために選んだ標準物質との間の比較評価は、妥当な測定法によって測定した値の 95%信頼区間 $Xi \pm U_{95}$（Xi）と、認証値の 95%信頼区間 $Ci \pm U_{95}$（Ci）との間の重なりの程度によって行う。認証値に対する測定値 Xi の、最小二乗法によって求めた回帰式 Xi=a+ b Ci からバイアスを求める。ここで、測定値と認証値それぞれの信頼区間を図で表した場合、両者は濃度が必ずしも同一ではないので、わかりにくい。そこで、認証値に対する測定値の比すなわち、$Xi/Ci \pm U_{95}$（Xi）/Ci 又は $1 \pm U_{95}$（Ci）/Ci をもって計算し図で表す方がわかりやすい。図３に例を示す。横軸は、評価を行った標準物質の種類を、縦軸はそれぞれの標準物質に対する測定値の平均値と認証値との比（Xi/Ci）とその測定の平均値の不確かさの範囲（95%）を示す。また、この範囲の上下横線は、補正認証値の 95%信頼区間を表わす。（補正認証値とは、総平均値を認証値とする）

試験方法は日本臨床化学会勧告法とした。その結果、これから表示値のバイアスは１%以内となっている。

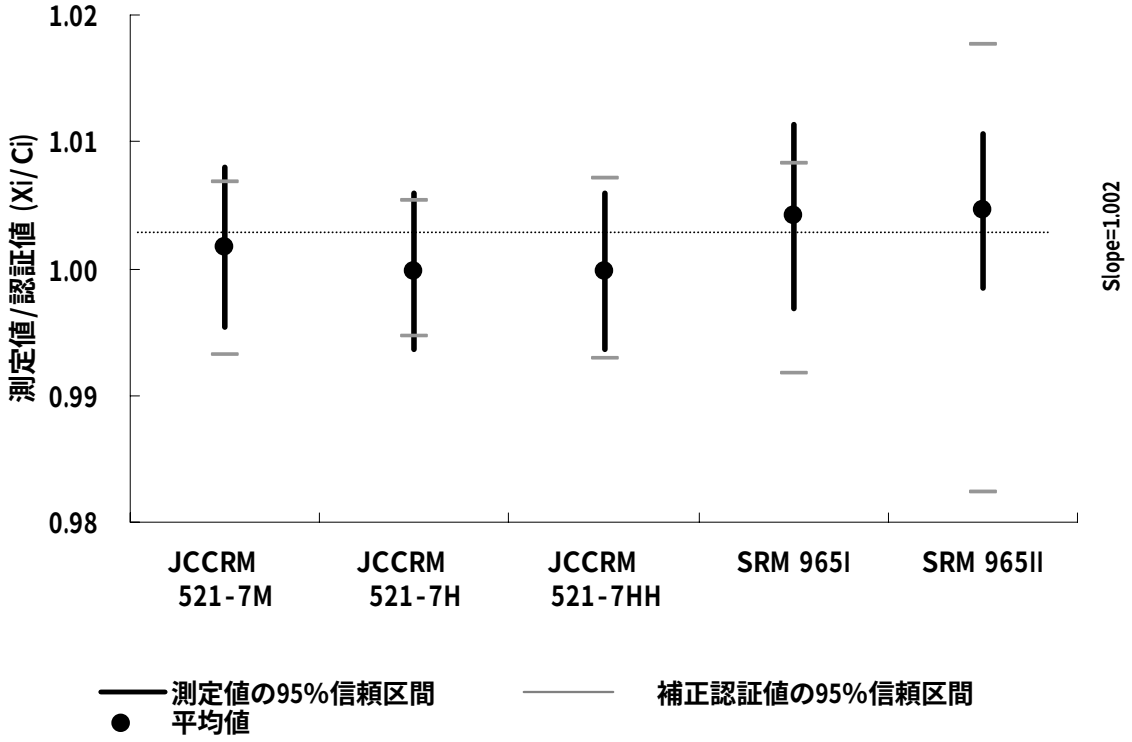


図３　比較評価試験結果

７．結論

トレーサビリティの体系に含まれるグルコース測定用常用標準物質の確立について検討を行った。表示値の測定方法としては、日本臨床化学会勧告法を採用したが、得られた表示値は、NISTのSRM965aと十分比較しうる正確さを有していた。また、その不確かさには、常用標準物質として十分小さい不確かさを得ることが出来た。

本常用標準物質は、出来る限り検体に類似したものとするため、血清の凍結品とし、防腐剤、安定剤を加えず、代わりに滅菌ろ過を行い、溶解後の安定性及び保存安定性を得ている。以上のように、日常測定法の正確さを評価することの出来るグルコース測定用常用標準物質が確立できた。

■文献

1） Neese JW, Duncan P, Bayse D, Robinson M,Cooper T, Stewart C : Development and evaluation of a hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase procedure for use as a national glucose reference method, HEW publication No.(CDC) 77-8330(1976)U.S. department of health, education and welfare, public health service, center for disease control, Atlanta, Georgia, U.S.A

2) NCCLS proposed standards:PSEP-4, protocol for establishing performance claims for clinical chemical methods, comparison of methods experiment , national committee for clinical laboratory standards.

3） 岡部紘明：IDMS による HK―G6PD 法の評価、第５回臨床化学会夏期セミナープログラム資料集：278-284，1985.

4） Igarashi S : Evaluation of the reference method for measurement of glucose based on isotope dilution mass spectrometry, The 6th international symposium on quality control-Osaka , Current Clinical Practice Series 47,p.14-20, Excerpta Medical Ltd., Tokyo ,1988.

5) 日本臨床化学会分析部会関東支部機器委員会：レファレンス法開発検討用分光光度計の性能規格、第５回臨床化学会夏期セミナープログラム資料集：79-83，1985.

6） 島崎道広、五十嵐すみ子、本永秀夫：レファレンス法によるフィールド法の評価（草案)、第８回臨床化学会夏期セミナープログラム資料集：204-208，1988.

7） David L. Duewer :Process for comparing certified values of the same measurand in multiple reference materials. JCTLM document WG1-P-04A,2005.

8） 日本臨床化学会試薬専門委員会：血清グルコース測定勧告法、臨床化学 33 巻補冊 1 号 116-123, 2004.

9） White V,E; Welch,M.J; Sun,T.; Schaffer,R.; Hertz, H.S.; Cohen,A.; The Accurate Determination of Serum Glucose by Isotope Dilution Mass Spectrometry – Two Methods; Biomed. Mass Spectrom.; Vol.9, pp.395-405(1982).

10) Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement,ISBN92-67-10188-9, 1stEd., ISO, Geneva, Switzerland, (1993): see also Taylor, B.N.; Kuyatt, C.E.; Guidelines for Evaluating Uncertainty of NIST Measurement Results, NIST Technical Note 1297;U.S. Government Printing Office: Washington, DC(1994).

２－２－３－３　尿酸

（本報告は、標準物質作製のための文書として作成されたものであり、かつ国際標準化のためにJCTLM ノミネーション用の邦文原稿としたものである。）

１．序文

血中尿酸の増加する代表的な疾患は通風である。この他に白血病や骨髄腫などの悪性腫瘍においても血中尿酸量は増加する。また尿酸の排泄は大部分が腎臓を介して行われるので、糸球体腎炎をはじめとする各種腎疾患において高尿酸血症の要因となる。このように、血中尿酸量の測定は上記などの高尿酸血症の診断及び治療において欠くことのできないものといえる。

血清尿酸の日常測定法としては、現在はウリカーゼを用いる酵素的測定法により行われている。この方法は、尿酸を特異的に分解する酵素ウリカーゼと、このウリカーゼ反応により生じた過酸化水素とペルオキシダーゼ反応を組合せるものであるが、これを原理として、種々の改良法が実用化され、施設間差が縮められてきているが、十分とはいえない。そこで、尿酸のトレーサビリティ体系の確立が求められており、本研究はその体系において重要な役割を担う標準物質の確立を目的に行われた。

尿酸測定のトレーサビリティ体系においては、純物質としての尿酸の一次標準物質（凝固点降下熱量分析法により純度を確定）と、血清マトリックスを有し、基準法である同位体希釈質量分析法により値決められた一次実試料標準物質が確立され、次に日本臨床化学会勧告法により値決めされ、一次実試料標準物質によりトレーサビリティが確認された尿酸常用標準物質の確立が必要である。そのトレーサビリティ体系を図１に示す。

本尿酸測定用常用標準物質の表示値は、実用基準法である日本臨床化学会勧告法により値決めすることにした。これは、血清を過塩素酸を用いて除タンパク後、逆相系高速液体クロマトグラフィーにより測定する方法であり、同位体希釈質量分析法との相関において良好な結果が得られている。

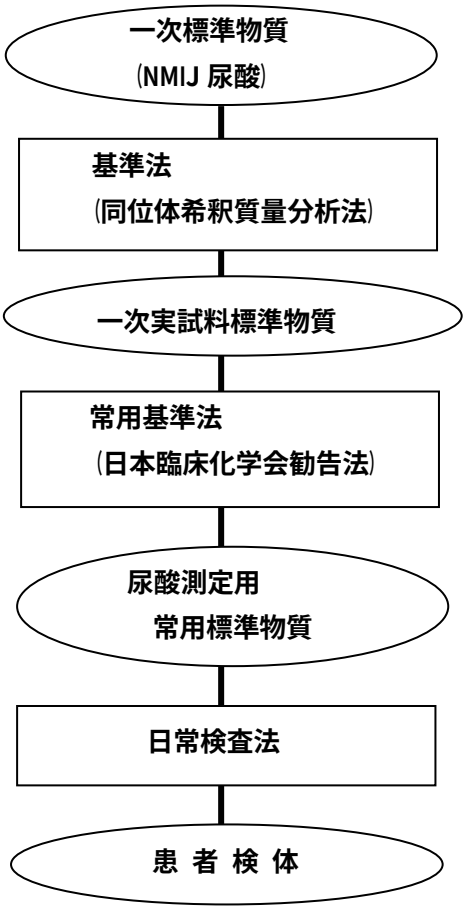

一次標準物質
(NMIJ 尿酸)
基準法
(同位体希釈質量分析法)
一次実試料標準物質
常用基準法
(日本臨床化学会勧告法)
尿酸測定用
常用標準物質
日常検査法
患 者 検 体

図1　尿酸の測定体系

２．尿酸測定用常用標準物質の規格

調製する試料の仕様を以下に示す。

（１）濃度は 4～13 mg/dl の範囲で 3 レベルとし、おおよその濃度範囲は以下の通りとする。

レベル１：4　～6.5　mg/dl

レベル２：7　～9　mg/dl

レベル３：11　～13　mg/dl

（２）密度は 1.022～1.025g/cm^3 (25℃)の範囲内とする

（３）総タンパク、アルブミン、コレステロール、及び中性脂肪については、いずれも基準範囲内のものとする。

（４）アンモニア性窒素は 0.15mmol/ｌ以下とする。

（５）アスコルビン酸　　0.2ug/ml 以下とする。

（６）感染性については、ＨＢｓ抗原陰性、ＨＣＶ抗体及びＨＩＶ抗体不検出のものとする。

３．尿酸常用標準物質の作製

（１）調製方法

調製方法の手順を以下に示す。

１）尿酸濃度が 4～6.5 mg/dl であることを測定により確認したヒト血清を、血清ろ過器を用いてろ過後、それを３分割し、それぞれレベル１，２，３の原料血清とする。

２）レベル１原料血清については、尿酸純品の添加を行わずに次工程に進む。

３）レベル２原料血清については､尿酸純品を希水酸化ナトリウム溶液に溶かした液を加えて、最終濃度が 7～9mg/dl の範囲内に入るように濃度調節し、均一となるまで混合する。均一になったか否かについては、サンプリングを行い、測定を行って確認する。

４）レベル３原料血清については、同様にして最終濃度が 11～13mg/dl の範囲内に入るように調節し、均一となるまで混合する。均一になったか否かについては、サンプリングを行い、測定を行って確認する。

５）レベル１，２，３の血清を、それぞれプラスチックバイアル瓶に分注器を用いて 1ml づつ分注し、フタを閉める。

（２）調製にあたっての注意事項

１）プラスチックバイアル瓶については、未開封のものを用いる。

２）尿酸純品は、試薬特級（純度 98%以上）を用いる。

３）分注器の分注精度は±0.1ml 以下のものを用いる。

４）濃度は、上記所定の範囲内の、できるだけ中間となるように調節する。

５）血清ろ過器は、滅菌消毒後、十分に洗浄した後、クリーシルーム内で風乾したものを用いる。

４．認証値の測定方法

（１）試薬

本法で用いる試薬の調製法を以下に示す。

１）0.3mol/l 過塩素酸

60％過塩素酸（JIS K8223 試薬特級）33ml を精製水で 1 l とする。

２）0.2mol/l リン酸二ナトリウム溶液

$NaHPO_4$・$12H_2O$（JIS K9019 試薬特級）71.7g を精製水で全量 1 l とする。

３）0.5mol/l リン酸溶液

85％リン酸（JIS　K9005 試薬特級）35ml を精製水で 1 l とする。

４）メタノールを含むリン酸緩衝液（74mmol/l,pH2.2）

２）の 0.2mol/l リン酸二ナトリウム溶液 70ml、３）の 0.5mol/l リン酸溶液 120ml を 1 l のシスメリンダーに入れ、精製水で全量 1 l とする。これにメタノールを 0-20ml(尿酸の保持時間で加減する)を加え、使用直前に２分脱気する。

５）0.01mol/l 炭酸リチウム溶液

炭酸リチウム（試薬特級　99％以上）0.74g を精製水に溶かし全量 1l とする。

６）100mg/l(595μmol/l)尿酸標準液

尿酸（NIST SRM 913a,純度 99.6%）100.3mg を秤量ビンに採り、小ロートを用いて検定済みの 100ml メスフラスコに入れ、0.01mol/l の炭酸リチウム溶液で溶解する（使用した秤量ビン、ロートは炭酸リチウム溶液で共洗し、全量 100ml とする）。これを検定済みの 10ml ホールピペットで採取し、検定済みの 100ml メスフラスコに入れ、精製水でメスアップする。100mg/l(595μmol/l)尿酸標準液として用いる。

（２）血清除タンパク前処理法

標準液および血清試料 0.2ml を遠心管に採り、これに 0.3mol/l 過塩素酸 2.0ml を加えてミキサーで混和後、氷水中で 30 分間以上放置する。次に混和し、3000rpm で、10 分間遠心分離する。上清を別の試験管に移し、再度 3000rpm で、10 分間遠心分離する。その上清 0.3ml を HPLC（高速液体クロマトグラフィー）サンプルカップに採り、0.2mol/l　Na_2HPO_4 溶液 0.3ml を加えて、混和したものを HPLC の試料とする。

（３）ＨＰＬＣの操作条件

カラムは逆相系（ODS）を用い、溶離液はメタノールを含むリン酸緩衝液（pH2.2）とする。流速 1.0ml/min で、試料 100μl を注入し、ループカット方式で 50μl を HPLC で分析する。尿酸のピークは 5-10 分で検出するようにし、用いるカラムによりメタノール含量や流速など分析条件を変更する。検出は波長 284nm で行い、濃度はピーク面積法で算出する。

５．表示値及び不確かさ

今回調製した標準物質について、前述の測定方法により測定して得られた値とその不確かさを以下に示す。

	レベル1	レベル2	レベル3	
尿　酸	4.35 ± 0.03	7.71 ± 0.06	11.11 ± 0.07	mg/dl
	0.26 ± 0.002	0.46 ± 0.004	0.66 ± 0.004	mmol /l

1)不確かさは ISO 指針（GUM：計測における不確かさの表現のガイド）に従って求め、拡張不確かさで表した。拡張不確かさ U は、U＝ku で求められる。ここで u は合成標準不確かさを表わし、k は 95%信頼水準における t 分布から求められる包含係数であり、この場合 k ＝2.3 であった。

2)正確さのトレーサビリティの確保：表示値測定の標準液には、NIST SRM 913a 尿酸（純度 99.6±0.1%）を用いた。表示値の測定おける血清試料及び標準液の調製は、計量法校正事業者認定制度に基づく認定事業者により校正された天秤を用いて行った。

６．性状

（１）血清密度及び代表的成分

本常用標準血清の密度及び代表的成分について測定した結果を以下に示す。

項　目	参 考 値	単 位	測 定 方 法
密　度	1.024 (25℃)	g/cm^3	
総タンパク	7.3	g/dl	ビュレット法
アルブミン	4.4	g/dl	BCG 法
アンモニア性窒素	0.16	mg/dl	除タンパク比色法
アスコルビン酸	0.2 以下	μg/ml	比 色 法
総コレステロール	133	mg/dl	酵 素 法
中性脂肪	53	mg/dl	酵 素 法

＊参考値は中濃度血清を日常法で測定した値であり、正確さの評価に用いることはできません。

（２）均質性及び安定性

１）均質性

本常用標準血清は室温で液状であり、分注後は凍結状態で保管される。保管までは液状であるため、物理的には均質のはずである。しかし不十分な混合、容器の汚染、水分の蒸発等により、不測の問題が発生して均質でないことが起こりうる。このことは ISO ガイド 34 に特記されている。ガイド 34 によれば均質性試験におけるサンプリングは、このような例では、系統サンプリングが適するとしてある。そこで、本常用標準物質においては、系統サンプリングを採用することとした。すなわち、分注の最初、中間、及び最後の各グループから、それぞれバイアル容器を５本づつ抜き取り、均質性試験を行った。その結果、最初、中間、最後の各グループの平均値も有意な差（95%信頼区間）は見られず、均質であるといえる。

２）保存安定性

ISO ガイド 34 によれば、安定性試験は十分な均質性が実証された後で実施されなければならない。上記のように、均質性については十分といえるので安定性試験を行うこととした。安定性試験は２つに分類される。本常用標準物質は溶解後使用されるが、それが少なくとも常温で１時間は安定であるか否かという溶解後の安定性と、もう 1 つは保存安定性である。前者については、溶解直後、１時間後、及び、２時間後の試料を同時に精密測定法で測定し、差を比較する方法によった。試料はそれぞれ５本とした。その結果、溶解直後を基準とし、1 時間後及び２時間後の変化を求めたところ、それぞれ相対値で表すと＋0.4%、－0.2%となり、いずれも有意な差は見られなかった。以上から、溶解後２時間は安定であることが言える。

次に、保存安定性試験を行った。本常用標準血清は防腐剤を加えてないが、冷凍状態で保管されるので、冷蔵品又は凍結乾燥品と比較して保存安定性に優れている。尿酸の場合、経験的に-70℃以下で保存すれば長期間安定であることがわかっている。そこで、本研究では一歩進めて-20℃における安定性を調べた。すなわち１及び３ヶ月経過後に 5 本づつを抜き取り、-80℃保存のものを対照として比較を行った。その結果を図２に示す。これから、3 ヶ月間の保存安定性はあるといえるが、血清に濁りが生じていた。したがって、尿酸測定用常用標準物質は-70℃以下で保存することとした。

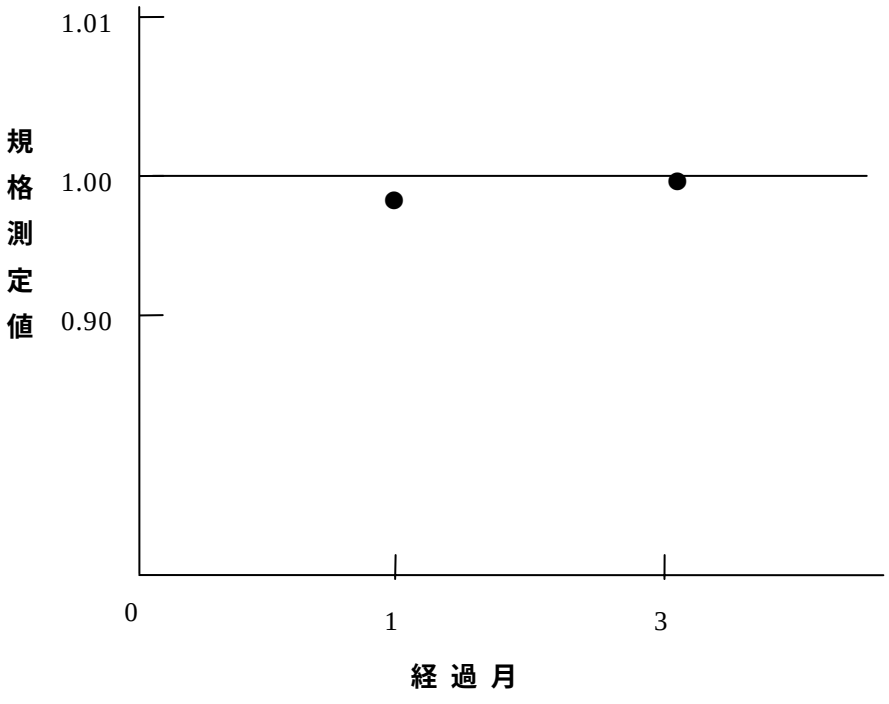


図２　保存安定性結果（スタート時を 1.00 とした）

３）表示値の評価

本常用標準物質の尿酸表示値について、NIST　SRM909b (Human Serum)との比較評価試験を行った。比較評価試験方法は、JCTLM のドキュメント JCTLM　WG1　P-04A（Process for Comparing Certified Valued of the same Measurand in Multiple Reference Materials）に従った。この方法の概要を以下に示す。

評価しようとする標準物質と、比較のために選んだ標準物質との間の比較評価は、妥当な測定法によって測定した値の 95%信頼区間 $Xi \pm U_{95}$（Xi）と、認証値の 95%信頼区間 $Ci \pm U_{95}$（Ci）との間の重なりの程度によって行う。認証値に対する測定値 Xi の、最小二乗法によって求めた回帰式 Xi=a+ b Ci からバイアスを求める。ここで、測定値と認証値それぞれの信頼区間を図で表した場合、両者は濃度が必ずしも同一ではないので、わかりにくい。そこで、認証値に対する測定値の比すなわち、$Xi/Ci \pm U_{95}$（Xi）/Ci 又は $1 \pm U_{95}$（Ci）/Ci をもって計算し図で表す方がわかりやすい。図３に例を示した。横軸は、評価を行った標準物質の種類を、縦軸はそれぞれの標準物質に対する測定値の平均値と認証値との比（Xi/Ci）とその測定の平均値の不確かさの範囲（95%）を示す。また、この範囲の上下横線は、補正認証値の 95%信頼区間を表わす。（補正認証値とは、総平均値を認証値とする）

試験方法は日本臨床化学会勧告法とした。その結果、これから表示値のバイアスは２%以内となっている。

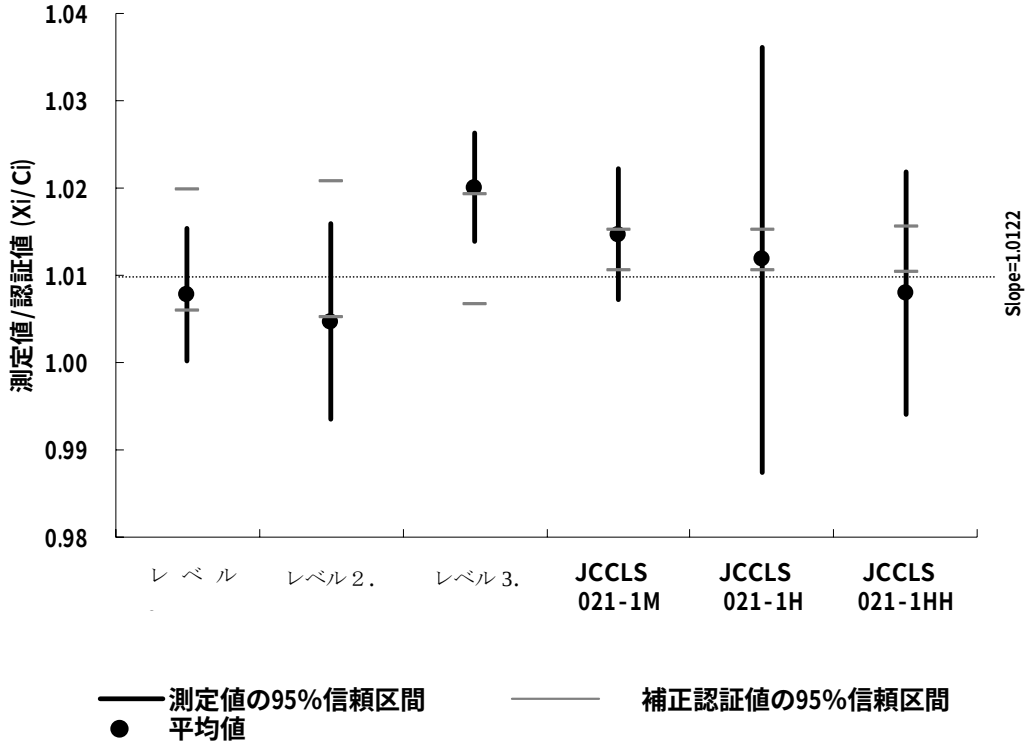


図３　比較評価試験結

７．結論

トレーサビリティの体系に含まれる尿酸測定用常用標準物質の確立について検討を行った。表示値の測定方法としては、日本臨床化学会勧告法を採用したが、得られた表示値は NIST の SRM909b と十分比較しうる正確さを有していた。またその不確かさは、常用標準物質として十分小さいものであった。

本常用標準物質は、出来る限り検体に類似したものとするため、血清の凍結品とし、防腐剤、安定剤を加えず、代わりに滅菌ろ過を行い、溶解後の安定性及び保存安定性を得ている。以上のように、日常測定法の正確さを評価することの出来る尿酸測定用常用標準物質を確立することが出来た。

■ 文献

１) Duncan PH, Gochmann N, Cooper T, Smith E, Bayse D : A candidate reference method for uric acid in serum, Clin Chem, 28:284-290, 1982.

２) Kageyama N : A direct colorimetric determination of uric acid in serum and urine with uricase-catalase system, Clin Chim Acta,31 : 421-432, 1971.

３) Pachla LA, Peter T : Measurement of serum uric acid by liquid chromatography, Clin Chem, 25 : 1847-1852, 1979.

４) Kock R, Delvoux B, Tillmanns U, Greiling H : A candidate reference method for the determination of uric acid in serum based on high performance liquid chromatography, compared with isotope dilution-gas chromatography-mass spectrometric method, J Clin Chem Clin Biochem, 27 : 157-162, 1989.

５) Ingebretsen OC, Borgen J, Farstad M : Uric acid determinations : reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet detection compared with kinetic and equilibrium adaptations of the uricase method, Clin Chem,28 : 496-498, 1982.

６) 坂本伸哉 : 試薬専門委員会プロジェクト経過報告－血清尿酸測定のリファレンス（HPLC-UV）法の確立、臨床化学，21（補）:15a,1992.

７) Sakuma R, Nishina T, Kitamura M, : Deproteinizing methods evaluated for determination of uric acid in serum by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet detection, Clin Chem, 33 : 1427-1430, 1987.

８) 仁科甫啓、佐久間良三、小島司、北村元仕、高原美華、岸波菊江子、坂本伸哉、小池恵美子 : 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による血清尿酸測定の標準化へのアプローチ I. 基礎的検討、尿酸（現；プリンピリミジン代謝)、10 : 33-39, 1986.

２－２－３－４ クレアチニン

（本報告は、標準物質作製のための文書として作成されたものであり、かつ国際標準化のためにJCTLM ノミネーション用の邦文原稿としたものである。）

１．序文

血清クレアチニンは最も簡便な腎機能の指標といえる。血清クレアチニン値とクレアチニンクリアランス（糸球体機能）とはほぼ双曲線の関係にあることから糸球体機能をある程度推定できることに血清クレアチニンの測定意義がある。また、クレアチニンは生理的変動が少なく、正常値の幅も狭いので、有力かつ確実な慢性腎不全悪化の指標となることが知られ、臨床検査において広くクレアチニンの測定が行われている。

血清クレアチニンの測定方法としては、現在 Jaffe 法が主として用いられているが、酵素的測定法も開発されている。Jaffe 法は、クレアチニンがアルカリ性条件下でピクリン酸と反応して付加化合物を生成し、紅色を呈する原理を応用したものであるが、この方法はクレアチニンに対して特異性が低く、感度も低いなどの問題がある。また酵素的測定法においても、正確さの評価は十分に行われているとはいえない。以上からクレアチニンのトレーサビリティ体系の確立は急務といえ、本研究はその体系において重要な役割を担う標準物質の確立を目的に行われた。

クレアチニン測定のトレーサビリティ体系においては、純物質としてのクレアチニン一次標準物質（凝固点降下熱量分析法により純度を確定したもの）と、血清マトリックスを有し、基準法である同位体希釈質量分析法により値決めされた一次実試料標準物質が確立され、次に、実用基準法により値決めされ、一次実試料標準物質によりトレーサビリティの確認されたクレアチニン常用標準物質が確立される必要がある。その体系を図１に示す。

本クレアチニン測定用常用標準物質の表示値は、常用基準法である日本臨床化学会勧告法により値決めすることにした。これは、血清をトリクロロ酢酸を用いて除タンパク後、逆相系高速液体クロマトグラフィーにより測定する方法であり、同位体希釈質量分析法との相関において良好な結果が得られている。

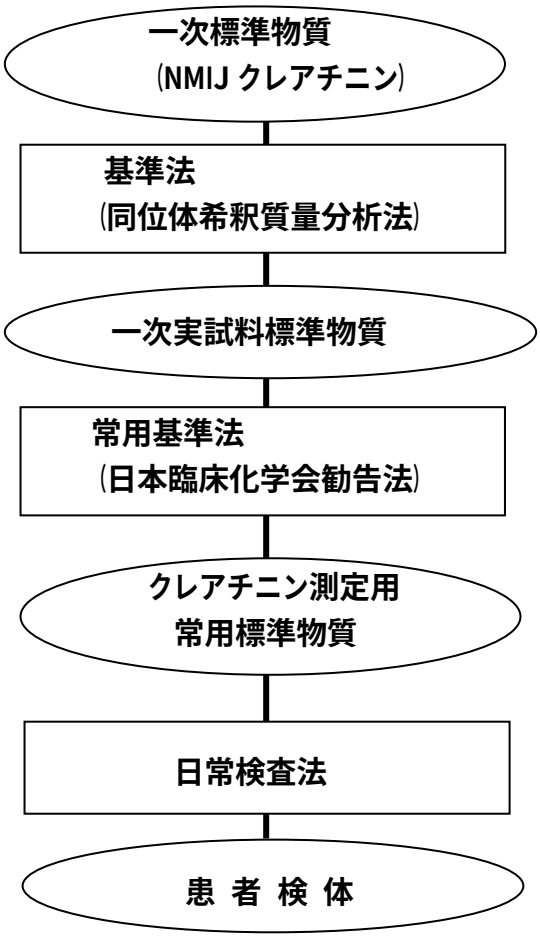


図1 クレアチニンの測定体系

2．クレアチニン測定用常用標準物質の規格

調製する試料の規格を以下に示す。

（1）濃度は 0.5～8mg/dl の範囲で 3 レベルとし、各レベルの濃度範囲は以下の通りとする。

レベル１：0.5 ～0.8 mg/dl

レベル２：1.5 ～2.5 mg/dl

レベル３：6 ～8 mg/dl

（2）密度は 1.022～1.025g/cm^3 (25℃)の範囲内とする。

（3）総タンパク量、アルブミン量、コレステロール濃度、及び中性脂肪濃度についてはいずれも基準範囲内のものとする。

（4）アンモニア性窒素は 0.15mmol/l 以下とする。

（5）感染性についてはＨＢｓ抗原陰性、ＨＣＶ抗体及びＨＩＶ抗原・抗体不検出のものとする。

3．クレアチニン測定用常用標準物質の作製

（１）調製方法

調製方法の手順を以下に示す。

１）クレアチニン濃度が 0.5～0.8mg/ dl であることを測定により確認したヒト血清を、血清ろ過器を用いてろ過後、それを３分割し、それぞれレベル１，２，３の原料血清とする。

２）レベル１原料血清については、クレアチニン純品の添加を行わずに次工程に進む。

３）レベル２原料血清については、クレアチニン純品を少量ずつ添加し、最終濃度が 1.5～2.5mg/dl の範囲内に入るように濃度調節し、均一となるまで混合する。均一になったか否かについては、サンプリングを行い、測定を行って確認する。

４）レベル３原料血清についてはクレアチニン純品を少量ずつ添加し、最終濃度が 6～8mg/dl の範囲内に入るように濃度調節し、均一となるまで混合する。均一になったか否かについては、サンプリングを行い、測定を行って確認する。

５）レベル１、２、３の血清をそれぞれプラスチックバイアル瓶に分注器を用いて 1ml づつ分注し、フタを閉める。

（２）調製にあたっての注意事項

１）クラスチックバイアル瓶については、未開封のものを用いる。

２）クレアチニン純品は、和光純薬工業製特級（純度 99%以上）を用いる。

３）分注器の分注精度は±0.1ml 以下のものを用いる。

４）濃度は、上記所定の範囲のできるだけ中間となるように調節する。

５）血清ろ過器は、滅菌消毒後十分に洗浄し、クリーンルーム内で風乾したものを用いる。

４．認証値の測定方法

（１）試薬

本法で用いる試薬の調製方法を以下に示す。

１）トリクロロ酢酸（TCA）除タンパク溶液

TCA（JISK8667 試薬特級）147g を 1l メスフラスコに入れ、精製水を加えて 1l としたもの（901.8mmol/l）。これはガラス瓶に入れて室温で保存する（TCA は吸湿性があるが、その許容誤差は±10%の範囲とする）。

２）溶離液

① A 液

$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$（JIS K9009 試薬特級）1.56g 及び Na_2SO_4（JIS K8987 試薬特級）14.2g を 1 l のメスフラスコに入れ、精製水で 1 l としたもの。

② B 液

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$（JIS K9019 試薬特級） 1.78g 及び Na_2SO_4 （JIS K8987 試薬特級）7.1g を 500ml のメスフラスコに入れ、精製水で 500ml としたもの。

③ 溶離液

A 液と B 液を、最終濃度が 10mmol/l NaH_2PO_4，10mmol/l Na_2HPO_4,100mmol/l Na_2SO_4 組成となるように適量混合し、20℃で pH5.75±0.05 に調製したもの。

３）クレアチニン標準液

① 0.1mol/l 塩酸溶液

塩酸（JIS K8180 試薬特級）を精製水で希釈して、0.1mol/l としたもの。

② 1,000mg/l クレアチニン標準原液

NIST の SRM914a（クレアチニン）を 50 以下で恒量になるまで乾燥し、その 1,000mg を秤量してメスフラスコに入れ、20 にて 0.1mol/l 塩酸溶液で 1 l としたもの。密栓して 2～5℃保存で 6 ヶ月は安定。

③ 100mg/l 標準液（884.9 μ mol/l）

使用時に、クレアチニン標準原液を 0.1mol/l 塩酸溶液を用いて正確に 10 倍に希釈したもの。

（２）測定操作法

１）血清除タンパク操作と酢酸エチル処理

実施に際しては、試料用、試薬用のホールピペットの共洗いを充分にして、同一器具を用いるようにする。

5ml 以上の試験管に、試料又は 100mg/l (884.9μmol/l)クレアチニン標準液を、1.0ml のホールピペットで各試験管に採取し、それぞれに 2.0ml のホールピペットで TAC 除タンパク液を混合しながら加える。室温に 10 分間放置の後、1,400g 以上で 10 分間遠心する。

遠心後の上清 1ml に、酢酸エチル 2ml を加えてよく混合し、室温に 30 分間静置する。上層の酢酸エチルをアスピレーターで除き、下層を測定試料とする。注入にあたってはサンプルループ内を良く共洗いし、20μl をインジェクトする。

２）測定

カラムと溶離液が規定の温度と流速に到達し、クロマトグラムのベースラインが安定していることを確認する。標準液及び、血清共に除タンパク及び酢酸エチル処理後の試料を有栓サンプルカップにいれ、オートインジェクターを用いて、又は用手の場合はループタイプのインジェクターを用いて、20μl を注入する。

血清試料の 1 回の同時測定は 20 本以内とし、標準液を先頭、中間、及び最後において、それぞれ 2 重測定する。なお、HPLC での測定は、除タンパク後の試料の安定性を考慮して 5 時間以内に実施する。

３）機器の測定条件

溶離液流量を 0.7ml/min、検出波長を 234nm とし、カラム温度は 40 とする。また検出器の測光レンジは約 0.64ABU/FS（フルスケール）とする。

５．表示値及び不確かさ

今回調製した標準物質について、前述の測定方法により測定して得られた値とその不確かさを以下に示す。

	レベル1	レベル 2	レベル 3	
クレアチニン	0.75 ± 0.01	1.78 ± 0.01	6.60 ± 0.05	mg/dl
	0.066±0.0009	0.157±0.0009	0. 584±0.004	mmol /l

1)不確かさは ISO 指針（GUM：計測における不確かさの表現のガイド）に従って求め、拡張不確かさで表した。拡張不確かさ U は、U＝ku で求められる。ここで u は合成標準不確かさを表わし、k は 95%信頼水準における t 分布から求められる包含係数であり、この場合 k ＝2.3 であった。

2)正確さのトレーサビリティの確保：表示値測定の標準液調製には、NIST SRM 914a 尿酸（純度 99.7±0.3%）を用いた。表示値の測定における血清試料及び標準液の調製は、計量法校正事業者認定制度に基づく認定事業者により校正された天秤を用いて行った。

６．性状の評価

（１）血清密度及び代表的成分

本常用標準血清の密度及び代表的成分について測定した結果を以下に示す。

項　目	参 考 値	単 位	測 定 方 法
密　度	1.024 (25℃)	g/cm^3	
総タンパク	7.3	g/dl	ビュレット法
アルブミン	4.4	g/dl	BCG 法
アンモニア性窒素	0.16	mg/dl	除タンパク比色法
アスコルビン酸	0.2 以下	μg/ml	比 色 法
総コレステロール	133	mg/dl	酵 素 法
中性脂肪	53	mg/dl	酵 素 法

（２）均質性及び安定性

１）均質性

本常用標準血清は室温で液状であり、分注後は凍結状態で保管される。保管までは液状であるため、物理的には均質のはずである。しかし不十分な混合、容器の汚染、水分の蒸発等により、不測の問題が発生して均質でないことが起こりうる。このことは ISO ガイド 34 に特記されている。ガイド 34 によれば均質性試験におけるサンプリングは、このような例では、系統サンプリングが適するとしてある。そこで、本常用標準物質においては、系統サンプリングを採用することとした。すなわち、分注の最初、中間、及び最後の各グループから、それぞれバイアル容器を５本づつ抜き取り、均質性試験を行った。その結果、最初、中間、最後の各グループの平均値も有意な

差（95%信頼区間）は見られず、均質であるといえる。

２）保存安定性

ISO ガイド 34 によれば、安定性試験は十分な均質性が実証された後で実施されなければならない。上記のように、均質性については十分といえるので安定性試験を行うこととした。安定性試験は２つに分類される。本常用標準物質は溶解後使用されるが、それが少なくとも常温で１時間は安定であるか否かという溶解後の安定性と、もう 1 つは保存安定性である。前者については、溶解直後、１時間後、及び、２時間後の試料を同時に精密な測定法で測定し、差を比較する方法によった。試料はそれぞれ５本とした。その結果、溶解直後を基準とし、1 時間後及び２時間後の変化を求めたところ、それぞれ相対値で表すと＋0.5%、－0.7%となり、いずれも有意な差は見られなかった。これから、溶解後２時間は安定であることが言える。

次に、保存安定性試験を行った。本常用標準血清は防腐剤を加えてないが、冷凍状態で保管されるので冷蔵品又は凍結乾燥品と比較して保存安定性に優れている。また、クレアチニンの場合、経験的に-70 以下で保存すれば長期間安定であることがわかっている。そこで、本研究では一歩進めて-20 における安定性を調べた。すなわち 1 及び３ヶ月経過後に 5 本づつを抜き取り、-80℃保存のものを対照として比較を行った。その結果を図２に示す。これから、3 ヶ月間の保存安定性はあるといえるが、血清に濁りが生じていた。したがって、クレアチニン測定用常用標準物質は-70℃以下で保存することとした。

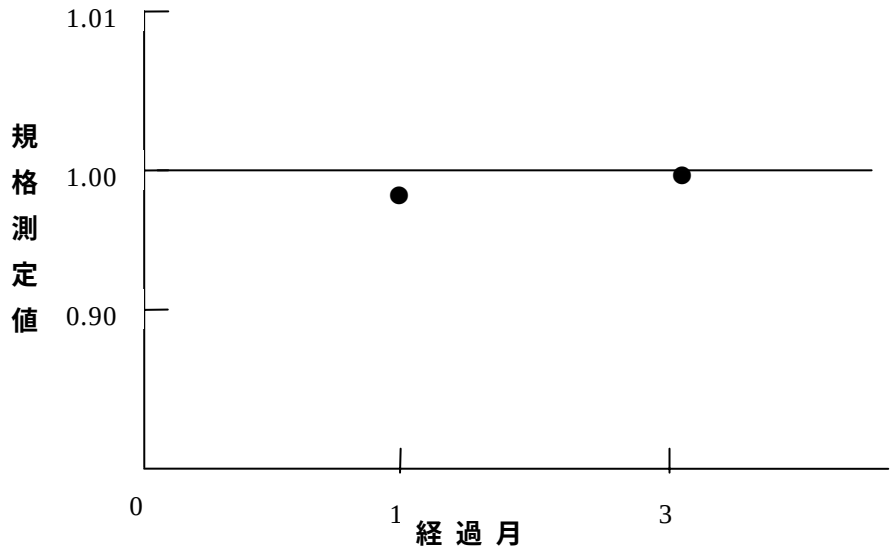


図２　保存安定性結果（スタート時を 1.00 とした）

３）表示値の評価

本常用標準物質のクレアチニン表示値について、NIST　SRM909b (Human Serum)及び IRMM BCR 575(クレアチニン)との比較評価試験を行った。比較評価試験方法は、JCTLM のドキュメント JCTLM　WG1 P-04A（Process for Comparing Certified Valued of the same Measurand in Multiple Reference Materials）に従った。この方法の概要を以下に示す。

評価しようとする標準物質と、比較のために選んだ標準物質との間の比較評価は、妥当な測定法によって測定した値の 95%信頼区間 $Xi \pm U_{95}$（Xi）と、認証値の 95%信頼区間 $Ci \pm U_{95}$（Ci）との間の重なりの程度によって行う。認証値に対する測定値 Xi の、最小二乗法によって求めた回帰式 Xi=a+ b Ci からバイアスを求める。ここで、測定値と認証値それぞれの信頼区間を図で表した場合、両者は濃度が必ずしも同一ではないので、わかりにくい。そこで、認証値に対する測定値の比すなわち、$Xi/Ci \pm U_{95}$（Xi）/Ci 又は $1 \pm U_{95}$（Ci）/Ci をもって計算し図で表す方がわかりやすい。図３に例を示す。横軸は、評価を行った標準物質の種類を、縦軸はそれぞれの標準物質に対する測定値の平均値と認証値との比（Xi/Ci）とその測定の平均値の不確かさの範囲（95%）を示す。また、この範囲の上下横線は、補正認証値の 95%信頼区間を表わす。（補正認証値とは、総平均値を認証値とする）

試験方法は日本臨床化学会勧告法とした。その結果、これから値のバイアスは 2%以内となっている。

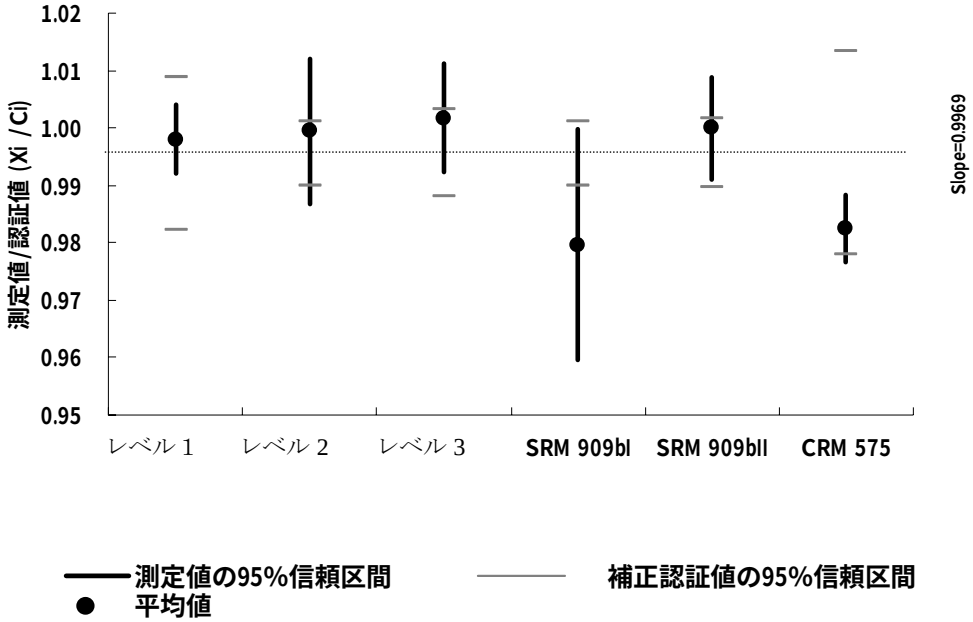


図３　比較評価試験結果

７．結論

トレーサビリティの体系に含まれるクレアチニン測定用常用標準物質の確立について検討を行った。表示値の測定方法としては、日本臨床化学会勧告法を採用したが、得られた表示値は NIST の SRM909b と十分比較しうる正確さを有していた。また不確かさは、常用標準物質として十分小さいものであった。

本常用標準物質は、出来る限り検体に類似したものとするため、血清の凍結品とし、防腐剤、安定剤を加えず、代わりに滅菌ろ過を行い、溶解後の安定性及び保存安定性を得ている。以上のように、日常測定法の正確さを評価することの出来るクレアチニン測定用常用標準物質を確立することが出来た。

■ 文献

1） Brown ND,Sing HC, Neeley WE, Koetits SE :Determination or “true” serum creatinine by high-performance liquid chromatography combined with a continuous-flow microanalyzer, Clin Chem,23:1281-1283,1977.

2） Rosano TG, Ambrose RT,Wu AHB, Swift TA, Yadegari P : Candidate reference method for determining creatinine in serum : method development and interlaboraotry validation. Clin Chem,36 : 1951-1955,1990.

3） Linnet K and Bruushuus I, HPLC with enzymatic detection as a candidate reference method for serum creatinine, Clin Chem,37 : 1669-1675,1991.

4） 関東支部試薬委員会含窒素グループ:高速液体クロマトグラフィーによるクレアチニンの標準測定法、臨床化学、14、補刷 1 : 70-78,1985.

5） 大澤進 : クレアチニン・プロジェクト・グループ : 血清クレアチニン測定の勧告法（試薬専門委員会)、臨床化学、21 補冊 1 : 66a-68a,1992

6） Aoki Y, Naitoh T, Hata T, Itoh H : Determination of serum creatinine by high performance liquid chromatography, Kitasato Arch Exp Med,61 : 215-223,1988

7） Guy JM, Legg EF : An improved cation exchange HPLC method for the measurement of serum creatinine, Ann Clin Biochem,27 : 223-226,1990.

8） Etoh T, Iwatake M, Miyazaki M., Harada K, Nakayama M, Suhgi A, Uji Y, Okabe H : Simultaneous determination of creatinine and uric acid in serum by high performance ion exchange chromatography with direct injection. J Liq Chromatogr 15:1565-1575, 1992

9） Joint Committee on Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM)Home Page. http://www.bipm.fr/en/committees/jc/jctlm/ (accessed 14 January 2004).

２－２－３－５　コリンエステラーゼ

要旨
１）血清コリンエステラーゼ活性測定用の酵素標準物質について設定した。
２）値付けの測定方法は、JSCC 勧告法を用いた JCCLS-SOP 法である。
３）酵素標準物質は、性状を確定したヒト血清を用いた。値付けは JCCLS-SOP 法による共同実験方式で行った。
４）認証値の決定は ISO ガイド 35 に従った。

１．目的

ヒト血清中のコリンエステラーゼ[Cholin- esterase EC 3.1.1.8,Acylcholine　acyl- hydrolase，ChE]活性測定の勧告法について、日本臨床化学会では測定方法選択の基準として以下の条件を挙げた。
１）反応機序が明確でモル吸光係数による計測が可能であること。
２）ChEに特異的であって他の水解反応を含まないこと。
３）至適基質濃度，至適 pHを維持しての測定が可能であること。
４）ジブカイン（dibucaine）,フルオライド（fluoride）などによる阻害試験が的確に行えること。
５）試薬の入手が容易であること。

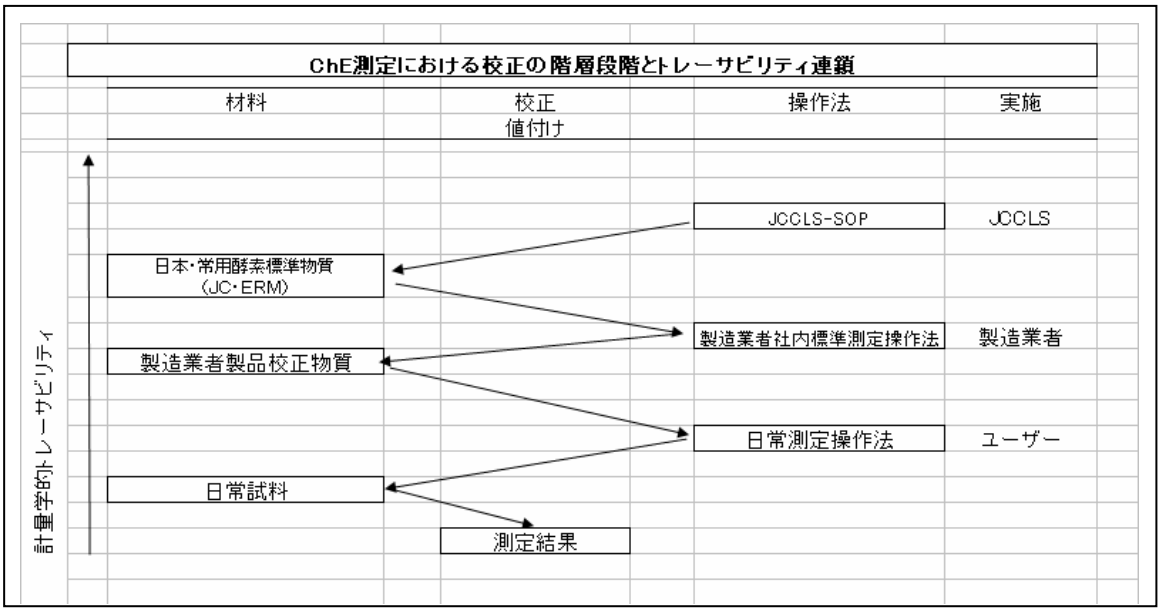
その結果、p-Hydroxybenzoylcholine を基質とする酵素法が選択された。すなわち ChE は基質である p ヒドロキシベンゾイルコリン（p-Hydroxybenzoylcholine iodide, pHBC）を加水分解し、コリンと p ヒドロキシ安息香酸（p-Hydroxybenzoic acid, pHBA）を生成する（第一反応)。次いで pHBA は NADPH の存在下、4 ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素（4-Hydroxybenzoate 3-monooxygenase, 4-HBO）によりプロトカテキュ酸(Protocat-echuic acid，PCA)に変換される(第二反応)。このとき酸化される NADPH の 340nm における吸光度の減少より ChE 活性を求める。第二反応の進行に伴って生ずる PCA の蓄積は主反応の吸光度測定に正誤差を与えるので、プロトカテキュ酸酸素添加酵素（Protocatechu-ate 3,4 dioxygenase, PCO）を反応液に共存させて測定系から除去する。

本法は、血清 ChE 測定の日常検査法に対して基準となる測定法として、日常検査法による測定値のトレーサビリティを保つこと、あるいは常用酵素標準物質の値付けのために用いるものとして JSCC 勧告法として設定された。

本 JSCC 勧告法を用いて JCCLS で SOP 法を準備し、共同実験により性状を規定したヒト血清試料に対して共同実験方式により値付けの作業を行い、得られた結果を用いて ISO ガイド 35 にしたがって認証値と不確かさを決定した。

２．測定体系

血清コリンエステラーゼ活性測定のための測定体系は、以下のごとく設定した。



３．JCCLS-SOP 法

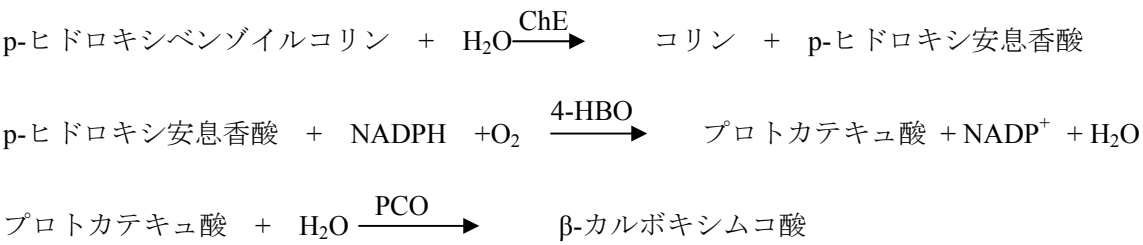
JSCC 勧告法を用いて JCCLS-SOP 法を以下のごとく設定した。

JCCLS による酵素活性測定の標準操作法（SOP）(Ver.1.0)コリンエステラーゼ(ChE)
Standard Operating Procedure(SOP) for the Measurement of Catalytic Concentration of ChE [ChE : Cholinesterase, EC 3.1.1.8] by JCCLS

文献

１）日本臨床化学会：ヒト血清中酵素活性測定の勧告法―コリンエステラーゼ　臨床化学 32：162-179, 2003

反応原理



試料

ChE-ERM

反応液最終濃度

トリス・マレイン酸緩衝液	50 mmol/l
pH（37 ℃）	8.0 ± 0.1
NADPH	0.20 mmol/l
FAD	2.0 μmol/l
BSA	0.20 % (w/v)
4-HBO	0.90 U/ml
PCO	0.38 U/ml
pHBC	1.0 mmol/l
サンプル試薬比	0.03333（1：30）

測定条件（用手法）

温度	37 ℃±0.1 ℃
波長	340 nm±0.5 nm
バンド幅	≦2 nm
光路長（計測値付）	10 mm±0.01 mm
予備加温時間	300 秒
待ち時間	60 秒
測定時間	120 秒
読み取り（測定ポイント）	≧4

試薬溶液 1（200 mmol/l マレイン酸溶液）
―マレイン酸（C4H4O4 MW:116.07）2.3214g を秤量する
―約 800 ml の純水に溶解する
―100 ml のメスフラスコへ移す
―メスフラスコの標線まで純水でメスアップする

試薬 I（反応溶液）(62.0 mmol/l Tris-Malate 緩衝液(pH8.0,37℃), 0.25 mmol/l NADPH, 2.5 μmol/l FDA, 0.25％(w/v) BSA, 1.12 U/ml 4-HBO, 0.47 U/ml PCO,)
―Tris(hydroxymethyl)aminomethane 7.51 g を精製水 900 ml に溶解し、37℃に保ちながら試薬溶液１を 67ml 加えて p H を 8.0±0.1 に調整する。
―NADPH 0.227 g, FAD 2.1 mg, BSA 2.50 g, 4-HBD 1.116U, PCO 470 U を加えて溶解する
―1000 ml のメスフラスコへ移す
―メスフラスコの標線まで純水でメスアップする

試薬Ⅱ（反応開始液）(6.2 mmol/l pHBC 溶液)
―pHBC（$C_{12}H_{18}O_3NI$ MW:351.18） 2.18g を精製水に溶解し全量を 1000mL とする。

分析パラメーター

表１に分析パラメーターを示した。

表１　分析パラメーター

代表的な機種での設定	用手法	自動分析法
測定温度(℃)	37	37
試料（μl）	80	8
試薬Ⅰ（μl）	2000	200
試薬Ⅱ（μl）	400	40
総量（μl）	2480	248
S/V	1/30	1/30
波長(nm)	340	(主/副)：340/405
測光ポイント	試薬Ⅱ添加後、1 分間放置後、2 分間の吸光度変化量を測定し、1 分間あたりの吸光度を算出する	

測定操作法（用手法）

試薬 I　　2.0 ml
試薬 I を吸収セルに採り、攪拌しながら 37℃になるまで予備加温する。
検体　　0.08 ml
攪拌しながら５分間加温する。
試薬Ⅱ　　0.4 ml
37℃で５分間予備加温した試薬Ⅱを添加後、37±0.1℃で攪拌を続けながら 60 秒間の待ち時間をとった後、波長 340 nm で 120 秒間測定し A1/min を算出する。
試薬ブランクの測定は検体の代わりに生理食塩水を添加する。
検体　　ΔA1/min
試薬ブランク　　ΔA2/min

計算

測定された ΔA1/min および ΔA2/min を次式に代入して、CK 活性を計算する。
ただし、試薬・試料容量は実測値を代入して計算する。

$$\text{CK 活性(U/l)} = \frac{(\Delta A1/\text{min} - \Delta A2/\text{min})}{6.3 \times 10^{3}} \times \frac{2.48}{0.08} \times 10^{6}$$

４．酵素標準物質

（１）酵素標準物質候補品の性状

ヒト血清を用いた酵素標準物質候補品の性状確認内容を以下に示した。

項　目	常用酵素標準物質規格	ＥＲＭ-ＣｈＥ第１ロット候補品の特性
２．原料		
２．１ 酵素の起源	１）ヒト体液、組織酵素 ヒト組織培養系、培養細胞系酵素 ヒト組換え型酵素 ２）酵素の起源と精製の程度を明示する ３）アイソエンザイム数は一種類以上含む	１）ヒト体液、組織酵素 「赤血球､唾液」 ヒト組換え型酵素を使用 ２）酵素起源　Pseudo-cholinesterase （ヒト血漿由来） 精製程度　部分精製品 ３）
２．２ 基　材	１）ヒト血清あるいは同等の特性を有する	１）ヒトプール血清
２．３ 干渉物質	１）ＪＳＣＣ常用基準法の活性測定に影響を与えない	１）影響を与えない
２．４ 添 加 剤	１）添加剤の有無を明示する 「種類，添加量」 ２）ＪＳＣＣ常用基準法の活性測定に影響を与えない	１）添加剤 有り ２）影響を与えない
２．５ 感染物質	１）検出されない［最小限厚生省通達を満たすこと」 ２）感染性物質として取り扱う	１）HBs抗原(-),HTLV-1抗体(-) HIV-1,-2抗体(-)，HCV抗体 (-) ２）感染性物質として取り扱う
３．製品特性		
３．１ 形　状	１）凍結乾燥品，凍結品，液状品	１）凍結乾燥品
３．２ 包　装	１）密封する 「内容物が変質しないように」	１）ガラス バイアル品 「ゴム栓，ｷｬｯﾌﾟで密封」 ２）容量：３ｍｌ／バイアル
３．３ 酵素の反応性	１）ヒト血清と同じである	１）ヒト血清中酵素と同等
３．４ 物理化学的性質	凍結乾燥品規格	
３．４．１ 比　重	１）範囲：1.020～1.060(25℃)	１）測定値：　1.023（25℃）
３．４．２ 粘　度	２）範囲：1.40 ～ 2.30 mPa （25℃） ［装置，ｳｴﾛｰﾃﾞ型粘度計］	２）測定値：　1.68　mPa　　（25℃） ［装置，ﾊﾞｲｵﾚｵﾗｲｻﾞｰ回転式粘度計］
３．５ 酵素動力学的性質	１）Ｋｍ値はＪＳＣＣ常用基準法指示の試薬系より求める	１）Ｋｍ値はヒト血清中酵素と近似

項　目	常用酵素標準物質規格	ＥＲＭ-ＣｈＥ第１ロット候補品の特性
３．６ 安定性 ３．６．１ 開封前	１）有効期間内で±５％以内の変化 ２）試験期間は有効期間を越える事 ３）有効期間は１年以上必要	１）～ ３） 参考データ １９ヶ月で±５％以内の変化 但し、－２０℃保存
３．６．２ 開封後	１）常温（２５℃前後），１日以上において ±５％以内の変化	１）２５℃、１日で ±５％以内の変化〈安定性は満足されている〉
３．７ 均一性 ３．７．１ バイアル間差	１）同一ロットから無作為に数 バイアル選びｎ回反復測定する ２）有意差検定は分散分析法により解析 ３）安定性試験と組み合わせて実施可	１）同一ロットから無作為に２０バイアル選び２回反復測定 ２）バイアル間差〈均一性は満足されている〉
４．酵素活性域規格	設 定 値 範 囲	設 定 値
JSCC常用基準法表示(37℃)	ＣｈＥ：４００～６００ U/L	ＣｈＥ：規格範囲内
５．表示値 ５．１ 表示値	１）ＪＳＣＣ常用基準法	１）ＪＳＣＣ常用基準法を使用
５．２ 表示値の信頼性	１）信頼区間は別途定める	１）９５％信頼区間内

（２）測定

ヒト血清候補品（凍結乾燥タイプ）について用手法で測定した。実施施設は用手法 13 施設（病院など５，メーカー８）、自動化法 12 施設（病院４，メーカー８）であった。測定数は３バイアルについてそれぞれ二重測定とした。測定結果について集計および解析を行い、認証値と不確かさを求めた。以下に代表的な測定パラメーターを示した。

測定条件（用手法）

温度	37 ℃±0.1 ℃
波長	340 nm±0.5 nm
バンド幅	≦2 nm
光路長（計測値付）	10 mm±0.01 mm
予備加温時間	300 秒
待ち時間	60 秒
測定時間	120 秒
読み取り（測定ポイント）	≧6

日立 U3200 の場合の分析パラメーター

	日立U3200の場合	
測定温度(℃)	37	
試料(μL)	0．080mL	0.1 mL
試薬Ⅰ(μL)	2．00mL	2.5 mL
試薬Ⅱ(μL)	0．40mL	0.5 mL
総量(μL)	2．480mL	
S/V	1／26	でも可
波長(nm)	340	

測定操作法（用手法）

試薬Ⅰ　　2.00 ml
試薬Ⅰを吸収セルに採り、攪拌しながら 37℃になるまで予備加温する。

検体　　0.08 ml
検体 0.08 ml を添加し、攪拌しながら 5 分間加温する。

試薬Ⅱ　　0.40 ml
37℃で５分間予備加温した試薬Ⅱを添加後、37±0.1℃で攪拌を続けながら 60 秒間の待ち時間をとった後、波長 340 nm で 120 秒間測定し A1/min を算出する。

試薬ブランクの測定は検体の代わりに生理食塩水を添加する。
検体　　ΔA1/min
試薬ブランク　　ΔA2/min

計算

測定された ΔA1/min および ΔA2/min を次式に代入して、CK 活性を計算する。
ただし、試薬・試料容量は実測値を代入して計算する。

$$\text{CK 活性(U/l)} = \frac{(\Delta A1/\text{min} - \Delta A2/\text{min})}{6.3 \times 10^3} \times \frac{2.48}{0.08} \times 10^6$$

（３）認証値

共同実験方式により得られたデータを用いて認証値を ISO ガイド 35 に基づいた方法により決定した。

測定温度：37 ℃

項目名	認証値（U/ L）	拡張不確かさ（U/ L）*
pseudo-ChE	508	±8

*不確かさは、均質性と実験誤差成分を含む総合的な拡張不確かさ（包含係数 $k = 2$）として示した。なお、本品の安定性の信頼限界は、測定誤差を含んだ相対安定性（±２・CV%）として、2.5%である。

２－２－３－６　グリコアルブミン

要旨

１）血清中のグリコアルブミン測定についての標準化について検討をした。

２）このうち基準測定操作法および血清標準物質の性状規格について設定した。

３）基準測定操作法は、アルブミンの糖化リジン量の総量をデオキシアミノヘキシトール(DAH)化後塩酸水解―LC/ID-MS 法により求める。また、同時にアルブミン量を改良型 BCP 法で求める。得られた結果から、アルブミン量中のグリコアルブミンの比をとり、これをパーセントで表す。本法の検量に用いる純物質として、高純度リジン標準物質および高純度ヒト血清アルブミンを設定する。

４）血清標準物質の性状規格については、密度、蛋白成分、含窒素成分、還元剤成分、脂質成分について規定した。

１．目的

グリコアルブミンは、アルブミンとグルコースが非酵素的糖化反応により結合したケトアミンである。アルブミンはヘモグロビンより血中半減期が短いため、HbA1c よりも血糖コントロールの状態の変化をより迅速にかつ鋭敏に把握できることから、糖尿病治療開始時の効果判定に有用であり、また、不安定型糖尿病の治療評価など厳格なコントロールが必要な場合の指標として有用である。その他、グリコアルブミンは HbA1c に比較して、肝機能又は腎機能障害の影響を受けにくいといわれており、このような病態での血糖コントロールの把握にも有用である。

このように、グリコアルブミンは血糖コントロールにおける重要な指標であるが、測定方法としては、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）が長年用いられてきた。しかし、カラムの状態、測定条件等によって値が異なるという問題がある。また、カラムへの非特異吸着の問題もあり、真の値を HPLC 法では知ることができない。近年、酵素法が普及しているが、これは従来の HPLC による平均的な値に合うように補正が行われている。

以上から、グリコアルブミン測定のトレーサビリティの確立を行い、真度のよりどころを標準物質によって提供することが、強く求められている。本研究では、現在、グリコアルブミンの測定方法が定まっていないため、想定されるトレーサビリティ体系を組み立てる。そのためにグリコアルブミンは、総アルブミンとの比率で表わされ、糖化したアルブミンの量は糖化アミノ酸残基である糖化リジンを遊離し、それを正確に定量する方法が開発されている。一方、アルブミンは JCTLM に免疫比濁法が実用分析法として登録されていることから、それらを基にトレーサビリティ体系案を作成する（図１）。

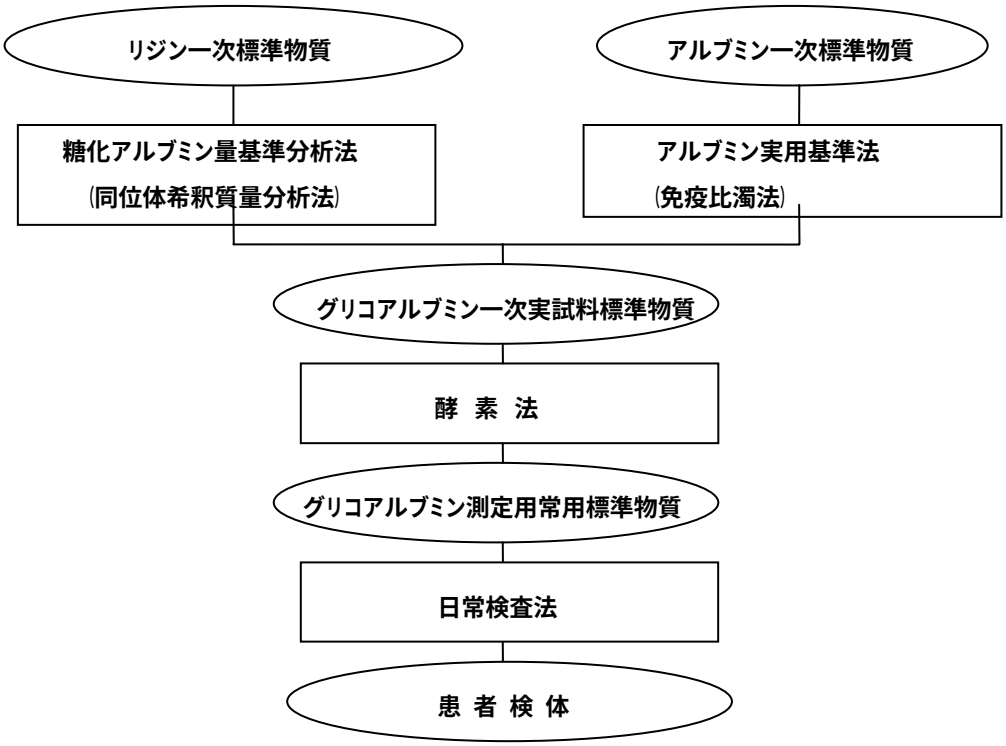


図1 グリコアルブミンの測定体系

2．グリコアルブミン測定用常用標準物質の規格

調製する試料の規格を以下に示す。

（1）濃度は、10～40%の範囲で３レベルとする。おおよそ濃度範囲は以下の通りとする。

レベル１： 10 ～ 20 %

レベル２： 20 ～ 30 %

レベル３： 30 ～ 40 %

（2）感染性については、Hbs 抗原陰性、HCV 抗体及び HIV 抗原・抗体不検出のものとする。

3．グリコアルブミン測定用常用標準物質の作製

（1）調製方法

調製方法の手順を以下に示す。

1）原料をグリコアルブミン濃度 10～20%、20～30%、30～40%に仕分けし、それぞれについてろ過器を用いてろ過後、プラスチックバイアル瓶に分注し、蓋を閉める。

（2）調製にあたっての注意事項

1）プラスチックバイアル瓶については、未開封のものを用いる。

2）分注器の分注精度は±0.1ml 以下のものを用いる。

3）濃度は、所定の範囲のできるだけ中間となるように調節する。

4）血清ろ過器は、滅菌消毒後十分に洗浄し、クリーンルーム内で風乾したものを用いる。

４．認証値の測定方法

現在検討中であるが、「トータル糖化リジン測定法」についてのこれまでの検討結果は以下のごとくまもめられる（図２―５）。

・測定原理は、デオキシアミノヘキシトール(DAH)化後塩酸水解―LC/ID-MS 法による。

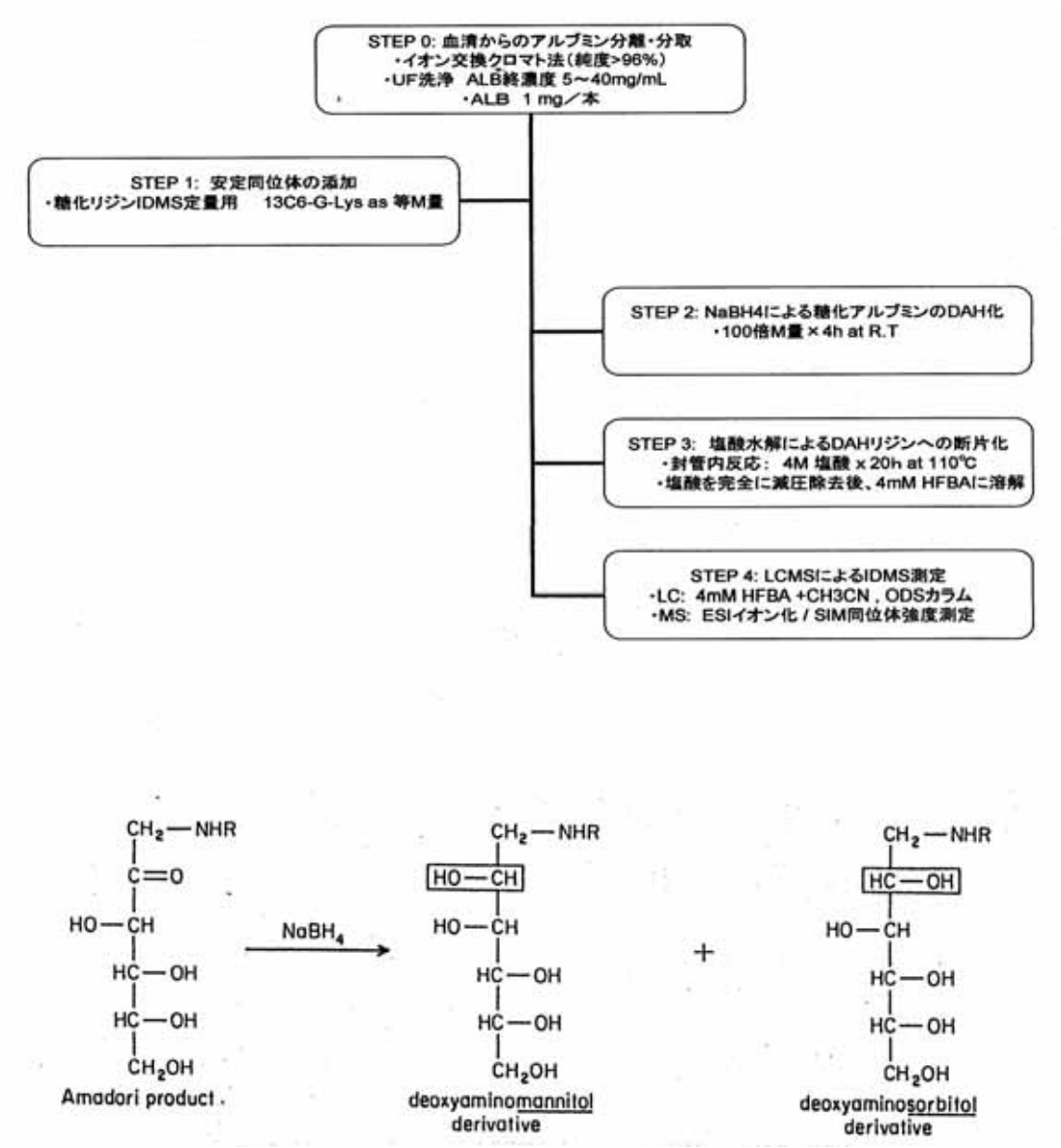


図２　総リジン測定のための基準測定操作法の測定原理と操作の手順

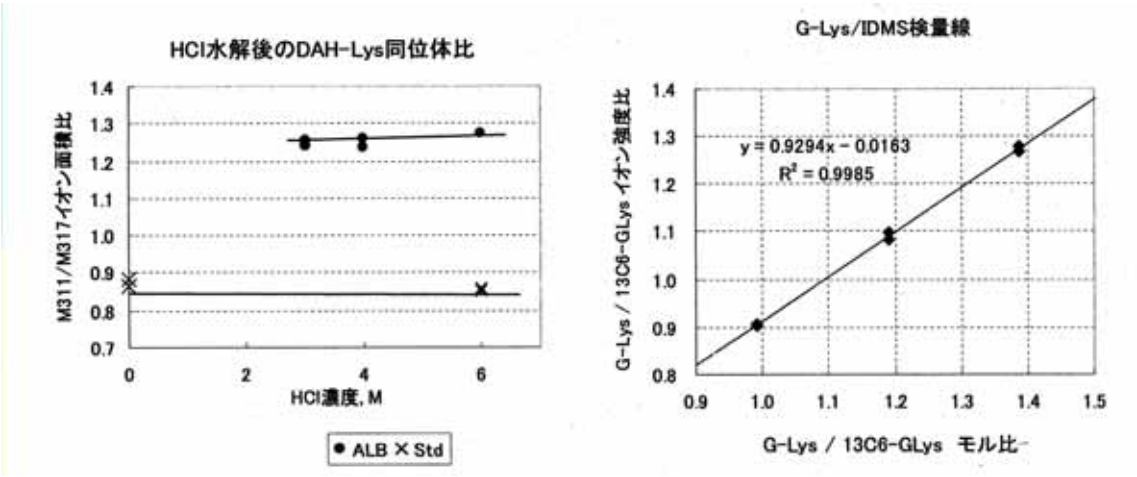


図３　測定条件の検討結果
HCl 水解後の DAH-Lys 同位体比と G-Lys/ID-MS の検量線

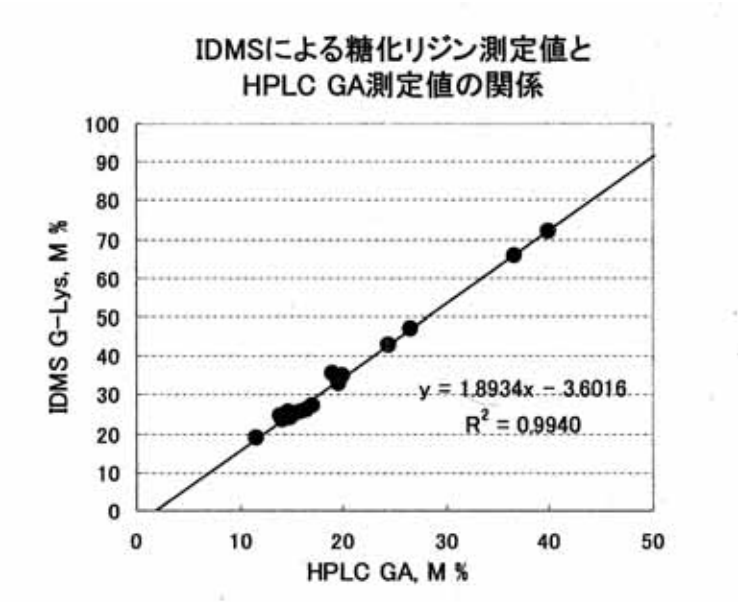


図４　ID-MS による糖化リジン測定値と HPLC GA 測定値の相関性

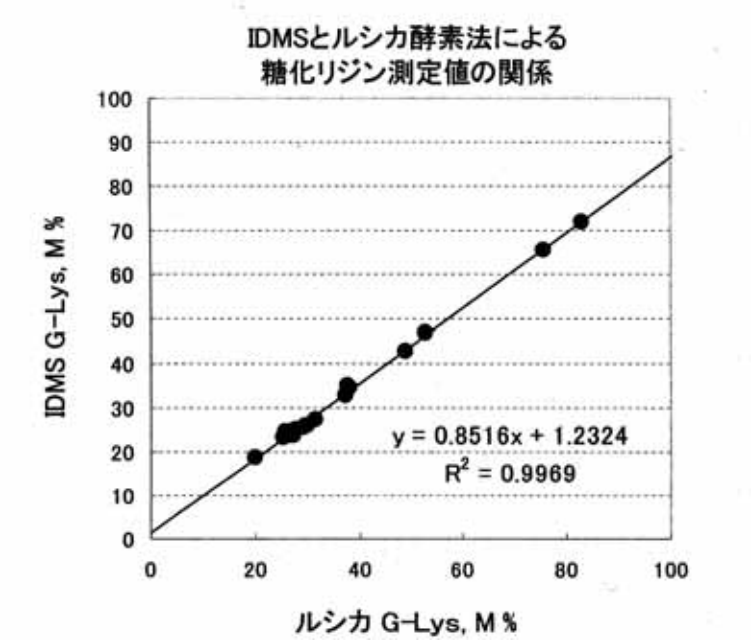


図５　ID-MS による糖化リジン測定値とルシカ酵素法による測定値の相関性

・プロテアーゼを用いたアルブミン分解を検討したが、分解不十分であった。
・“アルブミン精製→糖化リジン安定同位体添加→水素化→酸加水分解→水素化糖化リジンを LC-MASS で測定”という系を考案し検討した。
・酸加水分解の条件を最適化した。加水分解によって糖化リジンは一部分解するものの安定同位体との比率は一定であり、同位体希釈法で定量が可能であった。再現性は CV で約１％程度と推定される。
・実検体の日常測定法との相関は良好であった.

トータル糖化リジン割合＝1.893×HPLC－3.60

トータル糖化リジン割合＝0.852×酵素法（糖化アミノ酸濃度／ALB 濃度）＋1.23

・「トータル糖化リジン測定法」は基準法として提案可能である。但しアルブミン濃度の測定をどうするかが懸案事項。現行は改良 BCP 法である。
・「トータル糖化リジン測定法」は酵素法に良くあっており説明がしやすい。但し HPLC 法に合わせるには酵素法と同じように糖化アミノ酸濃度を GA 濃度に換算する必要があり、この説明は難しい。糖化アミノ酸濃度で表現しても良いがその場合値が日常測定法の約倍になってしまう。

５．表示値及び不確かさ

現在検討中である。

６．性状の評価

（１）血清密度及び代表的成分

本常用標準血清の密度及び代表的成分について測定した結果を以下に示す。

項　目	参 考 値	単 位	測 定 方 法
密　度	1.024（25℃）	g/cm^3	
総タンパク	7.3	g/dl	ビュレット法
アルブミン	4.4	g/dl	BCG 法
グロブリン	2.8	g/dl	免 疫 法
アンモニア性窒素	0.16	mg/dl	除タンパク比色法
アスコルビン酸	0.2 以下	μg/ml	比 色 法
総コレステロール	133	mg/dl	酵 素 法
中性脂肪	53	mg/dl	酵 素 法

（2）均質性及び安定性

1）均質性

本常用標準物質は室温で液状であり、分注後は凍結状態で保管される。保管までは液状であるため、物理的には均質のはずである。しかし不十分な混合、容器の汚染、水分の蒸発等により、不測の問題が発生して均質でないことが起こりうる。このことはISOガイド34に特記されている。ガイド34によれば均質性試験におけるサンプリングは、このような例では、系統サンプリングが適するとしてある。そこで、本常用標準物質においては、系統サンプリングを採用することとした。すなわち、分注の最初、中間、及び最後の各グループから、それぞれバイアル容器を５本づつ抜き取り、均質性試験を行った。その結果、最初、中間、最後の各グループの平均値も有意な差（95%信頼区間）は見られず、均質であるといえる。

2）保存安定性

現在検討中である

3）表示値の評価

現在検討中である。

7．結論

グリコアルブミン測定の標準化については、測定体系がほぼ設定できた。また、実試料標準物質に用いるベース血清の性状規格も設定できた。今後は、標準物質の値付けの測定方法を確立し、認証値の決定を行う。

２－２－３－７　イオン化カルシウム

（本報告は、標準物質作製のための文書として作成されたものであり、かつ国際標準化のためにJCTLM ノミネーション用の邦文原稿としたものである。）

１．序文

体内のカルシウムの内、99%以上が骨と歯に存在し、1%弱が骨格筋、細胞外液などに存在している。健常人の血清カルシウム濃度は約 10mg/dl であり、アルブミン結合形、Ca 塩の形、及びイオン化カルシウムの３分画に分けられる。血液中イオン化カルシウム濃度は、生理的に調節されているが、血液の pH変化とともに変動するため、体内の酸塩基平衡状態を診るのに有用である。

血液中のイオン化カルシウム濃度はイオン電極法により測定されるが、この方法は試料のマトリックスの影響を受けるため、マトリックスを有した標準物質による装置の校正が不可欠といえる。又、それにより、測定値の互換性が得られることになる。そこで、本研究では、イオン化カルシウム測定のための血清ベースの標準物質と、そのトレーサビリティ体系の確立を目的に行うこととした。

イオン化カルシウムの測定は、現状では基準法が設定できないため、実用基準法（IFCC 勧告法）で基準を設定する必要がある。すなわち、一次検量用溶液（Primary Calibration Solution, PCS）をもとに、実用一次検量用溶液（Modified Primary Calibration Solution, MPCS）を作製し、これを用いてイオン電極法による実用基準法を検量する。このとき用いるシステムは、IFCC 勧告規定されたレファレンス標準セル（Reference Standard Cell,RSC:Covingron-Umemoto cell）による。測定体系を図１に示した。

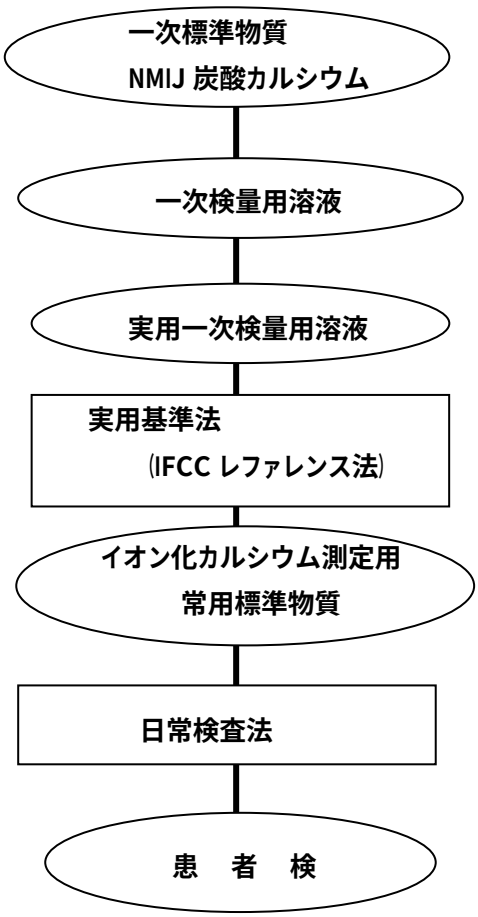


図1　イオン化カルシウムの測定体系

２．イオン化カルシウム測定用常用標準物質の規格

調製する試料の仕様を以下に示す。

（１）濃度は 0.7～1.7mmol/l の範囲で 3 レベルとし、おおよその濃度範囲は以下の通りとする。

レベル１：0.7　～1　　mmol/l

レベル２：1　　～1.3　mmol/l

レベル３：1.3　～1.7　mmol/l

（２）密度は 1.022～1.025g/cm3 (25℃) の範囲内とする。

（３）水分量　0.930±0.005Kg/l（25℃）の範囲内とする。

（４）pH は 7.45±0.05（37℃）の範囲内とする。

（５）感染性はＨＢｓ抗原陰性、HCV 抗体及び HIV 抗体不検出のもの

３．イオン化カルシウム測定用常用標準物質の作製

カルシウム濃度が低濃度及び正常域内である採血後 2 週間以内のヒト血清原料血清を用意し、低濃度用及び中濃度用はカルシウム濃度の調節は行わない。高濃度用は、塩化カルシウムを加え 1.3～1.7 mmol/l に濃度調整する。次に二酸化炭素を用いて血清の pH が、7.40±0.05(30℃)となるように調節後、非通気性の袋に密封して 20℃に設定した恒温水槽に入れる。この状態で血清の二酸化炭素ガス平衡を保ちつつ、ガラスアンプルに 1ml ずつ分注し直ちに溶封する。その後、-70℃で冷凍保管する。pH のバイアル間差は±0.01 以内とする。

４．表示値の測定方法

血清試料に対する pH 値およびイオン化カルシウム濃度値の決定のために用いる実用基準法は、それぞれ IFCC の pH 測定の勧告法およびイオン化カルシウム濃度測定勧告法に従い、規定された測定装置の性能を満たしたうえで実施する。なお検量用溶液の試薬規格と調製方法は、IFCC のイオン化カルシウム濃度測定の勧告法に従うとともに、測定はレファレンス標準セルによる。

（１）一次検量用溶液：PCS

本溶液の組成を表１に示す。

（２）実用一次検量用溶液：MPCS

本溶液は HEPES(1mmol/l)を含む一次検量用溶液である。

（３）試薬の規格

一次および実用一次検量用溶液を作製するために用いる試薬の規格を表２に示す。

（４）レファレンス標準セルの性能

本測定システムの要をなすレファレンス標準セルの性能規格を表３に示す。また、その測定手順の概略を図２に示す。すなわち規定された実用一次検量用溶液（MPCS）で電極を校正する。アンプル入りの血清試料を 25±0.1℃において融解して、一定温度のもとで攪拌することによりガス平衡とし pH を一定にする。次に、その電位を計測する。そののち電極を空気を混入しながら MPCS で 5 回以上洗浄したのち、再度 MPCS を導入してその電位を計測し、初期の電位が得られていることを確認する。このとき得られた血清試料の定量値を最終的な測定値とする。

表１　一次検量用溶液の組成

No	Ca^{2+} (mmol/l)	Ca^{2+} (mmol/Kg)	Na^{+} (mmol/Kg)	Cl^{-} (mmol/Kg)
1	1.250±0.006	1.266	156.25	158.75
2	0.250±0.001	0.253	159.25	159.75
3	2.500±0.01	2.526	152.50	157.50

pH 調節範囲：pH7-8, イオン強度：160.0±0.5 mmol/l

表２　試薬の規格

試薬	純度	備考
$CaCO_3$	99.9%以上	NIST　SRM　915
NaCl	99.9%以上	Ca 含量 2×10^{-6}%以下
HCl （30%）	99.9%以上	Ca 含量 0.01%以下
NaOH(50%)	99.9%以上	Ca 含量 0.1%以下
HEPES	99%以上	Ca 含量 0.1%以下

NIST:National Institute of Standads and Technology

SRM:Standard Reference Materials

表３　RSC の性能規格

	イオン交換体型	ニュートラルキャリア型
ネルンストスロープ（%）	98-100	98-100
レスポンスタイム（sec）		
95%	＜30	＜30
100%	120-150	120-150
ドリフト（mv/hr）	＜0.13	＜0.13
ノイズレベル（mv）		
MPCS*	＜±0.01	＜±0.01
血清	＜±0.02	＜±0.02
繰り返し性（mv）		
MPCS*	＜0.03	＜0.03
血清	＜0.05	＜0.05
キャリーオーバー（mv）	＜0.1	＜0.05

*modified primary calibration solution（実用一次検量用溶液）

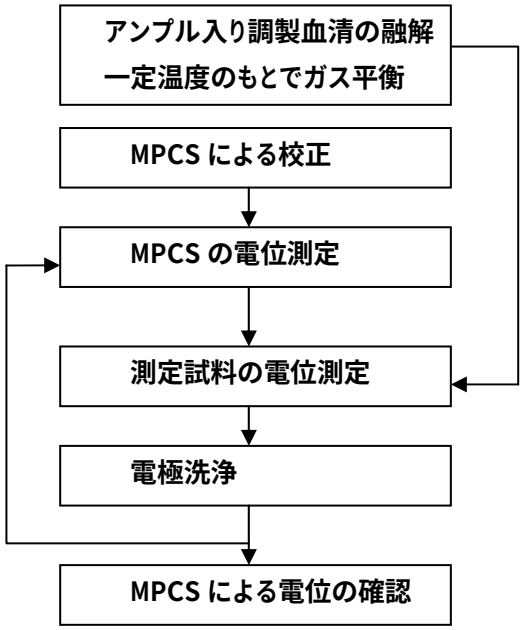


図２　RSC による測定手順の概略

５．表示値及び不確かさ

今回調製した標準物質について、前述の測定方法により測定して得られた値とその不確かさを以下に示す。

	レベル１	レベル２	レベル３	
イオン化カルシウム	0.92± 0.02	1.20 ± 0.03	1.51 ± 0.04	mmol /l

１）不確かさは ISO 指針（GUM : 計測における不確かさの表現のガイド）に従って求め、拡張不確かさで表した。拡張不確かさ U は、u を標準不確かさ、k を包含係数とし、U＝ku で求められる。

２）正確さのトレーサビリティの確保：表示値測定の標準液調製には、NIST SRM 915a 炭酸カルシウム（純度 99.965±0.015%）を用いた。表示値の測定における血清試料及び標準液の調製は、計量法校正事業者認定制度に基づく認定事業者により校正された天秤を用いて行った。

６．性状の評価

（１）血清密度及び代表的成分

本常用標準物質の密度及び代表的成分について測定した結果を以下に示す。

項　目	参 考 値	単 位	測 定 方 法
密　度	1.025（25℃）	g/cm^3	
粘性率	1.6（20℃）	mPa･s	
水分量	0.930（25℃）	ｋg/l	
ｐH（中濃度）	7.45（37℃）		
（高濃度）	7.45（37℃）		
HCO_3^-	25（37℃）	mmol/l	
Li	0.1 以下	mmol/l	フレーム光度法
NH_4^+	0.3	mmol/l	除タンパク比色法
無機リン	3.8	mg/dl	比 色 法
クエン酸	0.1	mmol/l	比 色 法
乳酸	3	mmol/l	酵 素 法
総タンパク	7.3	g/dl	ビュレット法
アルブミン	4.5	g/dl	BCG 法
中性脂肪	111	mg/dl	酵 素 法
総コレステロール	184	mg/dl	酵 素 法
リン脂質	210	mg/dl	酵 素 法

（２）均質性及び安定性

１）均質性

本常用標準血清は室温で液状であり、分注後アンプル封入され、凍結状態で保管される。分注までは液状であるため、物理的には均質のはずである。しかし不十分な混合、容器の汚染、水分の蒸発等により、不測の問題が発生して均質でないことが起こりうる。また、アンプル充填時の不測の原因により、アンプル充填したあるグループが不均質となることがある。ガイド３４によれば均質性試験におけるサンプリングは、このような例では、系統サンプリングが適するとしてある。そこで、本常用標準物質においては、系統サンプリングを採用することとした。すなわち、アンプルの最初、中間、及び最後の各グループから、それぞれバイアル容器を５本づつ抜き取り、均質性試験を行った。その結果、最初、中間、最後の各グループの平均値も有意な差（95%信頼区間）は見られず、均質であるといえる。

２）保存安定性

ISO ガイド 34 によれば、安定性試験は十分な均質性が実証された後で実施されなければならない。上記のように、均質性については十分といえるので安定性試験を行うこととした。安定性試

験は２つに分類される。本常用標準物質は溶解後使用されるが、それが、未開封（アンプル封入）の状態で、少なくとも常温で１時間は安定であるか否かという溶解後の安定性と、もう１つは保管安定性である。前者については、溶解直後、１時間後、及び、２時間後の試料を同時に精密な測定法で測定し、差を比較する方法によった。試料はそれぞれ５本とした。その結果、溶解直後を基準とし､1時間後及び２時間後の変化を求めたところ､それぞれ相対値で表すと－0.3%､+0.1%となり、いずれも有意な差は見られなかった。

以上から、溶解後２時間は安定であることが言える。

次に、保存安定性試験を行った。本常用標準血清は防腐剤を加えてないが、冷凍状態で保管されるので冷蔵品又は凍結乾燥品と比較して保存安定性に優れている。しかし、イオン化カルシウムの場合、冷凍であっても保存温度条件によっては長期間の保存中に変化が生じる恐れがある。しかし、経験的に-70℃以下で保存すれば長期間安定であることがわかっている。そこで、-20℃における安定性を調べた。すなわち、１，４，６ヶ月ごとに５本を抜き取り-80℃保存のものを対照として比較した。その結果を図３に示すが、－20℃での安定性はなく、したがって-70℃で保存する必要があることがわかる。

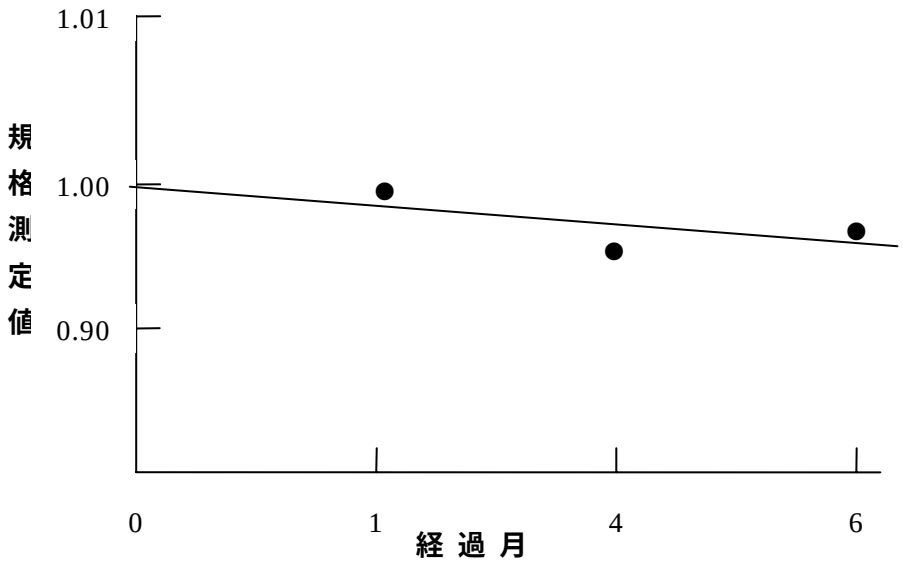


図３　保存安定性結果（スタート時を 1.00 とした）

３）表示値の評価

本常用標準物質のイオン化カルシウム表示値について、NIST SRM956b (Electroleytes in Frozen Human Serum)との比較評価試験を行った。比較評価試験方法は、JCTLM のドキュメント JCTLM WG1　P-04A（Process for Comparing Certified Valued of the same Measurand in Multiple Reference Materials）に従った。この方法の概要を以下に示す。

評価しようとする標準物質と、比較のために選んだ標準物質との間の比較評価は、妥当な測定法によって測定した値の 95%信頼区間 $Xi \pm U_{95}$（Xi）と、認証値の 95%信頼区間 $Ci \pm U_{95}$（Ci）との間の重なりの程度によって行う。認証値に対する測定値 Xi の、最小二乗法によって求めた回帰

式 Xi=a+ b Ci からバイアスを求める。ここで、測定値と認証値それぞれの信頼区間を図で表した場合、両者は濃度が必ずしも同一ではないので、わかりにくい。そこで、認証値に対する測定値の比すなわち、Xi/Ci±U_{95}（Xi）/Ci 又は 1±U_{95}（Ci）/Ci をもって計算し図で表す方がわかりやすい。横軸は、評価を行った標準物質の種類を、縦軸はそれぞれの標準物質に対する測定値の平均値と認証値との比（Xi/Ci）とその測定の平均値の不確かさの範囲（95%）を示す。また、この範囲の上下横線は、補正認証値の 95%信頼区間を表わす。（補正認証値とは、総平均値を認証値とする）なお、試験方法は日本臨床化学会勧告法とした。

７．結論

トレーサビリティの体系に含まれるイオン化カルシウム測定用常用標準物質の確立について検討を行った。表示値の測定方法としては、IFCC 勧告法を採用したが、NIST の SRM956b と十分比較しうる正確さを有していた。またその不確かさは、常用標準物質として十分小さいものであった。

本常用標準物質は、出来る限り検体に類似したものとするため、血清の凍結品とし、防腐剤、安定剤を加えず、代わりに滅菌ろ過を行い、溶解後の安定性及び保存安定性を得ている。以上のように、日常測定法の正確さを評価することの出来るイオン化カルシウム測定用常用標準物質を確立することが出来た。

■文献

1) Umemoto M, Tani W, Kuwa K : Development of reference materials for standardization of ionized calcium and blood gases, Electrolytes Blood Gases Other Crit Anal : Patient Measurement Government, 14 : 17-59, 1992.
2) Umemoto M, Tani W, Kuwa K, Ujihara Y. : Measuring calcium in plasma, Anal Chem 66:352A-356A, 1994.
3) Maas AHJ, Weisberg HF, Burnett RW, Muller-Plathe O, Wimberley PD, Zijlstra WG, Zijistra WG, Durst RA, Siggaard-Andersen O : Approved IFCC methods . Reference method(1986) for pH measurement in blood, Clin Chim Acta, 165 : 97-109, 1987.
4) 谷渉、梅本雅夫、桑克彦：イオン化カルシウム濃度測定の機器間差と標準試料、日本臨床化学会関東支部会誌、2(2) : 30-32, 1992.
5) 日本臨床化学会血液ガス・電解質専門委員会：血液中イオン化カルシウム濃度測定法－測定システムと標準血清、日本臨床化学会関東支部会誌、2(2) : 63-67, 1992.
6) Boink ABTJ, Buckley BM, Christiansen TF, Covington AK, Maas AHJ, Muller-Plathe O, Sachs C, Siggaard-Andersen O : IFCC recommendation on sampling, transport and storage for the determination of the concentration of ionized calcium in whole blood, plasma and serum, Eur J Clin Chem Clin Biochem, 29 : 767-772, 1991.
7) 桑克彦 : イオン化カルシウムの測定、検査と技術、19 : 119-124, 1991
8) Kuwa K, Umemoto M : Reference system for ionized calcium concentration measurement in blood, Clin Chem, 38 : 939, 1992.

２－２－３－８　ヘモグロビン A1c（HbA1c）

要旨

１）ヘモグロビン A1c（HbA1c）の標準化の用いる基準測定操作法と実試料標準物質の設定について検討した。

２）基準測定操作法は、国際的には IFCC 法(IFCC SOP)としてβ鎖 N 末端ヘキサペプチドを HPLC 分画後 ESI-MS あるいは IC(イオンクロマトグラフィ）で測定する monoglycated hexapeptide 測定法が確立されている。これは全血標準物質への値付けに用いる。この方法による測定値は、従来臨床側が用いてきた DCCT 値とは異なることから、現在国内外のデータの互換性の確保のための作業を行っている。

３）IFCC 法から精確さを伝達する実用的な基準測定操作法として、国内では HPLC を用いた KO500 法が組み立てられ、JSCC　SOP となる。本法では monoglycated hemoglobin が測定される。国内で用いる常用全血標準物質の値付けに本法が用いられる。

４）常用全血標準物質の性状規格を定めた。規定した成分は、総ヘモブロビン(Hb)濃度、HbF、MetHb、グルタチオンアダクト、異常 Hb、血漿成分である。これらの性状企画を有する試料の安定性は、-20℃保存で２ケ月間であった。

５）KO500 法を用いた共同実験方式により常用全血標準物質への値付けが可能となった。

１．目的

ヘモグロビンの寿命はアルブミンなどの他の血中タンパク質に比べて長く、ヘモグロビンが糖化した HbA1c は、約１ヶ月間の平均的な血糖レベルを反映することから、HbA1c は血糖コントロールを客観的に示す指標として日常検査において測定されている。HbA1c は高速液体クロマトグラフィー（HPLC 法）による測定が一般的であったか、近年は免疫学的測定法も広く普及している。

HbA1c は施設間差が大きい項目の一つであったが、日本糖尿病学会の臨床検査の標準化に関する委員会による標準化作業により、施設間差が縮小してきている。しかし、HPLC 法と免疫抗体法との原理的な違いによる差があること、HPLC 法においてもカラム分離能の差、分析条件の違い等による差異が存在するため、トレーサビリティのとれた標準物質の設定が、施設間差の解消に不可欠といえる。さらに、IFCC の HbA1c ワーキンググループによる、HbA1c の新しい定義に基づく標準化が進められており（図１）、将来はこれに基づいたトレーサビリティ体系を確立する必要がある。本研究は、これらを踏まえて、HbA1c 測定用常用標準物質を開発するために行われた。

上述の一つの目的である、国内における施設間差の縮小のためには、常用標準物質が伝達性を有し、値決めが信頼性の高い測定法により行われなければならない。また、基準範囲が大きく変わり、医療において混乱を生じないためには、従来の値と整合するような測定方法が望ましい。一方、IFCC の標準化と連携するには、IFCC レファレンス法による測定値が付されていることが必要である。したがって標準物質の使命からすれば、この両者をとり入れたものにすることが最も好ましいといえる。

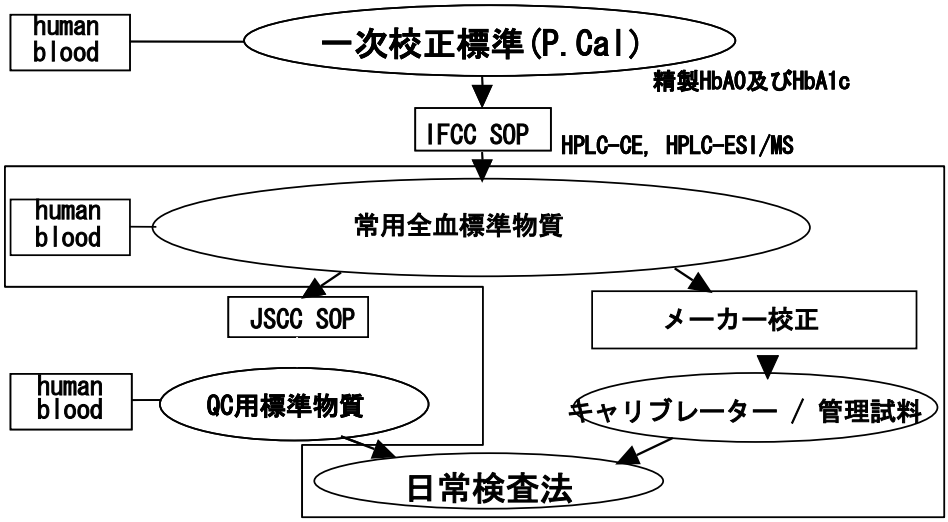


図１　SI 単位トレーサブルな IFCC 一次キャリブレータを用いる HbA1c の測定体系

２．HbA1c 測定用常用標準物質の規格

調製する試料の仕様を以下に示す。

（１）HbA1c 濃度は 4～13%範囲内であって 4～5，5～6，7～8，9～10，10 以上%の５レベルとする。

（２）総 Hb 濃度は 140±10 g / l とする。

（３）HbF は 1%未満とする。

（４）MetHb は 6%未満とする。

（５）グルタチオンアダクトは 0.5%未満とする。

（６）異常 Hb は含まれないこと。

（７）血漿成分は含まれないこと。

３．HbA1c 測定用常用標準物質の作製

調製方法について以下に示す。

まず異常ヘモグロビンを含まないヒト全血を各個体別に集め、HbA1c 濃度が 4～5%, 5～7%, 10%以上のものに区分けする。この３種のものを、それぞれについて遠心分離と生理食塩による洗浄を４回繰り返すことにより洗浄赤血球を得、ブレンドして 4～5，5～6，7～8，9～10，10 以上%のものを調整する。水を加えて洗浄後溶血させる。次に高速遠心分離法により血球膜ゴーストを除き、炭酸塩系緩衝液を加えて、透析したものを小分けして、液体窒素に保管する。

４．表示値の測定方法

日本臨床化学会、糖尿病関連指標委員会では、高分離能高速液体クロマトグラフィである KO500 法に用途や精度等の条件を付加し、実用基準法としている。

KO500 法は、イオン交換モードを用いた HPLC 法で、血中ヘモグロビンを細分画し、ヘモグロビンのβ鎖の N 末端にグルコースが 1 個結合したβ-N-[1-deoxyfructosyl]. hemoglobin（St-GhbA1c）を測定する方法である。

KO500 法は、イオン交換モードを用いた HPLC 法で、血中ヘモグロビンを細分画し、ヘモグロビンの β 鎖の N 末端にグルコースが 1 個結合した β- N- [1-deoxyfructosyl] – hemoglobin (St-GHbA1c)を測定する方法である。KO500 法は、HbA1c 測定体系において JSCC 標準法として位置付けられ、一次実試料標準物質の値付けおよび日常検査法の開発や評価などに用いられる他、実試料標準物質の性状確認にも用いられる。以下、KO500 法の概要について述べる。

（１）測定方法

１）試料の前処理

血中試料より血漿を取り除き、赤血球層と同量のサンプル希釈液（2mmol/L HEPES,0.01％NaN_3, pH7.2）を加え溶血する。溶血後直ちに分析に供するか、-70℃以下で保存し、分析前にサンプル希釈液にて 8 倍希釈し、遠心分離（9000g、5 分、4℃）後、上清を HPLC 注入サンプルとする。

２）分析条件

カラムA; TSK-gel GlycoHSi, 4.6 x 100mm (Tosoh)

カラムB; SS-Glycopak, 4.6 x 100mm (Shiseido)

流速: 0.4 mL/min

カラム温度: 25℃ Column A,　20℃ Column B

溶離液 A: 20mmol/L MES, 20mmol/L HEPES, 0.01% NaN_3 (pH5.20)

溶離液 B: 20mmol/L MES, 20mmol/L HEPES, 400mmol/L NaCl, 0.01% NaN_3 (pH7.00)

検出: 415nm

注入量: 4 μL

グラジエント

Column A:

時間（分）	0	10	16	17	35	36	38	39	50
% B	18	19	23	24	27	80	80	18	stop run

Column B

時間（分）	0	10	16	17	35	36	38	39	50
% B	16	17	18	20	23	80	80	16	stop run

３）測定値の算出

St-GHbA1c ピーク面積の総ヘモグロビンピーク面積に対する百分率を St-GHbA1c(%)とする。

（２）再現性

同時再現性は、コントロール物質(IBM9602)の 10 回の測定において、St-GHbA1c(%) ; 3.02±0.01 (AVE+1SD)、CV 0.43％であった。日間再現性は、コントロール物質(IBM9909)の 18 回の測定において、St-GHbA1c(%) ; 3.09±0.04 (AVE+1SD)、CV 1.25％であった。

（３）KO500 法の分離

KO500 法では、不安定型 HbA1c、カルバミレイテッドヘモグロビン、アセトアルデヒド結合ヘモグロビン、グルタチオン結合ヘモグロビン、HbF も検出することができ、これらの成分は、St-GHbA1c と良好な分離を示した。

（４）St-GHbA1c 分画の質量分析

KO500 法より分取した St-GHbA1c 分画について質量分析を行ったところ、St-GHbA1c 分画は、ヘモグロビンの β 鎖にグルコースが 1 個結合したものより成ることが確認された。

（５）IFCC 法との相関

一次検量用物質(primary calibration material)における、KO500 法の St-GHbA1c 値とペプチドマッピング法の Gβ 値の相関は、$y = 1.0592x - 0.0674$、$R^2 = 0.9982$ であり、両者はほぼ同等の値を示した。

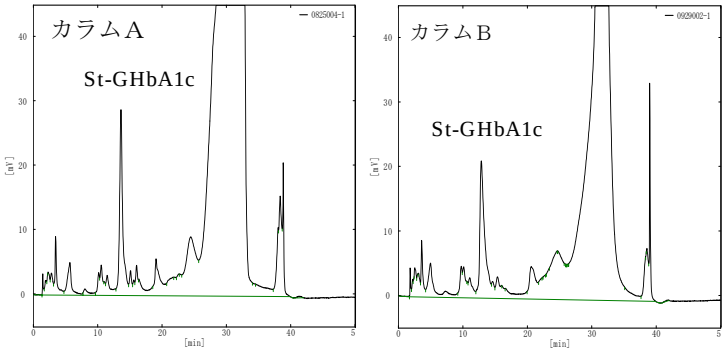


Fig.1 KO500 法におけるコントロール物質のクロマトグラム

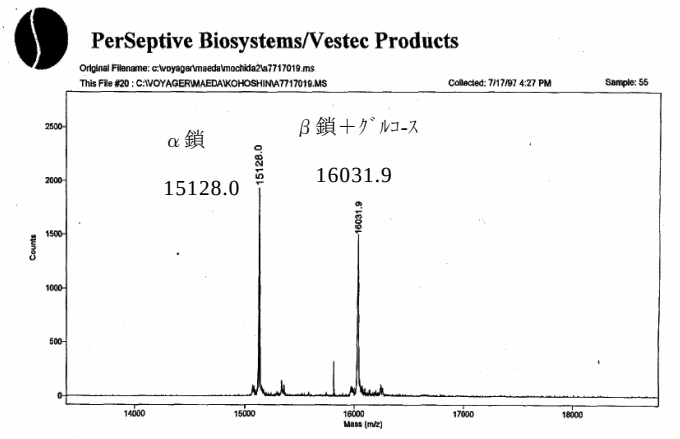


Fig.2. St-GHbA1c 画分の質量分析

５．表示値及び不確かさ

現在検討中である。

６．性状の評価

（１）血清密度及び代表的成分

本常用標準血清の密度及び代表的成分について測定した結果を以下に示す。

項　目	本標準物質の性状	測 定 方 法
材料	ヒト全血（n=約 30）	
総 Hb 濃度	125 ～ 135 g/l	ICSH 法
HbF	1%以下	KO500 法
MetHb	4 ～ 6 %	Van　Assendelft 法
グルタチオンアダクト	0.1%以下	KO500 法
異常 Hb	含まない	KO500 法
血漿成分	含まない	

（２）均質性及び安定性

１）均質性

本常用標準物質は室温で液状であり、分注後は凍結状態で保管される。分注までは液状であるため、物理的には均質のはずである。しかし不十分な混合、容器の汚染、水分の蒸発等により、不測の問題が発生して均質でないことが起こりうる。このことはISOガイド34に特記されている。ガイド34によれば均質性試験におけるサンプリングは、このような例では、系統サンプリングが適するとしてある。そこで、本常用標準物質においては、系統サンプリングを採用することとした。すなわち、分注の最初、中間、及び最後の各グループ 500 本から、それぞれバイアル容器を５本づつ抜き取り、均質性試験を行った。その結果、最初、中間、最後の各グループの平均値も有意な差（95%信頼区間）は見られず、均質であるといえる。

２）保存安定性

ISO ガイド 34 によれば、安定性試験は十分な均質性が実証された後で実施されなければならない。上記のように、均質性については十分といえるので安定性試験を行うこととした。安定性試験は２つに分類される。本常用標準物質は溶解後使用されるが、それが、未開封（アンプル封入）の状態で、少なくとも常温で１時間は安定であるか否かという溶解後の安定性と、もう 1 つは保存安定性である。前者については、溶解直後、１時間後、及び、２時間後の試料を同時に精密測定法で測定し、差を比較する方法によった。試料はそれぞれ５本とした。その結果、溶解直後を基準とし、1 時間後及び２時間後の変化を求めたところ、それぞれ相対値で表すと＋0.4%、－0.1%となり、いずれも有意な差は見られなかった。

以上から、溶解後２時間は安定であることが言える。

次に、保存安定性試験を行った。本常用標準物質は防腐剤を加えてないが、HbA1c の場合、冷凍であっても保存温度条件によっては長期間の保存中に変化が生じる恐れがある。しかし、経験

的に-70℃以下で保存すれば１ヶ年は安定であることがわかっている。以下では、より普及度の高い-20℃保存の冷凍庫での保存安定性を調べることとした。なお、HbA1c の-20℃の安定性については、原料により安定性が異なるため、５レベル全てにおいて行うこととした。その結果を以下の表に示す。これから、ユーザーにおいて一時保管に十分な期間である２ヶ月間の安定性に問題はない。

表　－20℃保存における２ヶ月間安定性

	レベル１	レベル２	レベル３	レベル４	レベル５
A(-70℃保存)	2.309	3.482	5.220	7.505	10.063
B(-20℃保存)	2.322	3.506	5.210	7.497	10.153
(B-A)/A　%	0.56	0.69	-0.19	-0.11	0.89

７．結論

トレーサビリティの体系に含まれるHbA1c測定用常用全血標準物質の確立について検討を行った。本常用全血標準物質は、出来る限り検体に類似したものとするため、調製法および規格を厳密なものとした。また、実験の結果、溶解後の安定性及び長期間の保存安定性は得られた。

２－２－３－９　インスリン、C-ペプチド、コルチゾール

要旨

１）血清中のインスリン、C-ペプチド、コルチゾール測定について、測定値の互換性の現状、実試料標準物質の設定、値付けの測定方法を検討した。

２）測定値の互換性の現状については、インスリンでは、外部精度評価結果ではキット間の変動係数 CV（%）は、試料 1 が 16.1%、試料 2 が 13.9%であった。大きなキット間差はないものの、同じ測定値として取り扱うことが可能な 10%の基準を超えていた。各社から報告された患者試料を使用した相関関係については、傾きおよび切片から判断すると 10%を超えるキット間差は無かった。C-ペプチドについては、キット内 CV%は 2 濃度ともに 10%以下であった。キット間変動はいずれの試料でも 15～20%前後であった。ツインプロットから測定法間に系統誤差がみられた。コルチゾールについては、キット内 CV%は 2 濃度とも 7～13%であり、キット間 CV%は試料 1 で 11.9%、試料 2 で 6.5%であった。指摘されたプレクリニカルクッシング症候群の診断基準付近のレベルの試料 1 は、1.75～4.93 ug/dl で測定値にばらつきがみられた。

3） 実試料標準物質の設定については、インスリンでは、公的標準品としての国際標準品（PNIBSC code66/304（Human insulin）あるいは NIBSC code83/500（Insulin crystal））を頂点とするトレーサビリティ連鎖を構成し、血清ベースの実試料標準物質を設定する。C-ペプチドについては、国際標準品（NIBSC 84/510 精製蛋白）を頂点とするトレーサビリティ連鎖を構成し、血清ベースの実試料標準物質を設定する。コルチゾールについては、国際標準品は設定されていない。純品（NIST SRM 921）および血清系（IRMM ERM DA-192 および DA-193）を頂点とするトレーサビリティ連鎖を構成し、血清ベースの実試料標準物質を設定する。

４）値付けの測定方法については、インスイン、c-ペプチドは LC-MS、コルチゾールは ID-GC/MS が可能である。

１．目的

本実試料項目群、J2（インスリン、C-ペプチド、コルチゾール）では、実試料系標準物質の作製を行い、市販試薬におけるデータの収束性を可能にすることを目的とする。

２．委員会の構成

本委員会は、実試料系標準物質項目群の柱１J2・WGで、メンバーの構成を下記に記す。

委員長	千葉　光一（(独）産業技術総合研究所）
	桑　克彦（筑波大学）
アドバイザー	富永　真琴（山形大学）
	武井　泉（慶應義塾大学）
	森下　芳孝（三重大学）
運営管理者	松川　岳久（アークレイ㈱）
委員	浅田　一（あすか製薬㈱）
	小林　隆（栄研化学㈱）
	坂崎　伸一郎（栄研化学㈱）

田野倉　修（㈱エスアールエル）
滝本　徹雄（オーソ・クリニカルダイアグノステイックス（株））
林　　司（㈱カイノス）
竹中　英樹(協和メデックス（株））
大石　久泰（協和メデックス（株））
誉田　大仁（三洋化成工業㈱）
斉藤　憲祐（デイドベーリング（株））
山岡　耕志（デイドベーリング（株））
牧　浩司（東ソー㈱）
高橋　進（日本シェーリング㈱）
真子　千枝（日本ビオメリュー㈱）
葉山　優（富士レビオ㈱）
佐伯　ひろみ（ベックマン・コールター（株））
下川　洋太郎（ロシュ・ダイアグノステイックス（株））
吉田　雅之（ロシュ・ダイアグノステイックス（株））
事務局　　藤橋　和夫（日本臨床検査標準協議会）

３．委員会の開催

第 1 回会合　2005 年 10 月 8 日（火）15:00～17:30（臨床検査薬協会会議室）第 2 回会合　2005 年 11 月 24 日(木)　13：00～17：00（臨床検査薬協会会議室）第 3 回会合　2005 年 12 月 21 日（水）13：00～15：00（TCAT 会議室）
第 4 回会合　2006 年 1 月 17 日（火）15：00～17：00（臨床検査薬協会会議室）
第 5 回会合　2006 年 2 月 15 日（水）15：00～17：00（臨床検査薬協会会議室）

４．標準物質の設定概要

（１）インスリン

１）測定値の互換性の現状

患者試料および精度管理試料でのキット間差の比較：2004 年に実施された第 26 回イムノアッセイ検査全国コントロールサーベイ成績報告によると、non-RI 法 65 施設と RI 法 15 施設の合わせて 80 施設の参加があった。キット間の変動係数 CV（%）は、試料 1 が 16.1%、試料 2 が 13.9%であった。大きなキット間差はないものの、同じ測定値として取り扱うことが可能な 10%の基準を超えていた。

一方、各社から報告された患者試料を使用した相関関係については、傾きおよび切片から判断すると 10%を超えるキット間差は無かった。

患者試料を使用した相関データ

報告企業	X軸	Y軸	傾き	切片	相関係数	例数	濃度範囲
富士レビオ	アボットRIA	富士レビオ	1.013	-0.057	0.994	169	0-200
富士レビオ	アボットRIA	富士レビオ	0.94	0.749	0.987	102	0-25
富士レビオ	東ソーAIA	富士レビオ	0.962	0.482	0.981	129	0-85
富士レビオ	東ソーAIA	富士レビオ	1.005	0.224	0.966	116	0-25
東ソー	アボットRIA	東ソーAIA	0.9497	-0.8341	0.9949		0-90
東ソー	ファルマシアRIA	東ソーAIA	1.007	-2.583	0.985	53	0-110
東ソー	AxSYM	東ソーAIA	0.867	-1.629	0.99	40	0-200
ロシュ	アボットRIA	ECLIA	0.9	-0.16	0.92		0-40

インスリン　(単位: μU/mL)

キット名	試料B-1 N	Mean	±	S.D.	C.V.	試料B-2 N	Mean	±	S.D.	C.V.
ケミルミ インスリン (ケンタウルス)	13	7.68	±	0.61	7.9	13	88.29	±	3.21	3.6
【CLIA】	11	7.67	±	0.33	4.3	12	89.03	±	1.88	2.1
アキシム インシュリン・ダイナパック 【EIA】	12	9.90	±	0.64	6.5	12	97.71	±	4.62	4.7
ST Eテスト「TOSOH」II (IRI)	11	8.01	±	0.81	10.1	11	78.45	±	4.57	5.8
【EIA】	10	8.19	±	0.57	7.0					
インシュリン・リアビーズII	8	9.09	±	0.24	2.7	8	91.57	±	2.14	2.3
【IRMA】	7	9.16	±	0.15	1.7					
エクルーシス試薬 インスリン 【ECLIA】	6	6.41	±	0.49	7.6	6	75.46	±	3.63	4.8
ルミパルスインスリン-N 【CLEIA】	6	7.97	±	0.13	1.6	6	83.69	±	2.00	2.4
スフィアライト インジュリン 【CLEIA】	5	9.11	±	0.71	7.8	5	86.50	±	4.09	4.7
インシュリン '栄研' 【RIA】	4	8.63	±	0.29	3.3	4	83.44	±	5.25	6.3
クオルタスシリーズ INSULIN試薬 【EIA】	3	9.13	±	0.37	4.1	3	91.77	±	4.28	4.7
Eテスト「TOSOH」II (IRI) 【EIA】	3	9.57	±	2.37	24.8	3	90.20	±	10.22	11.3
シオノリアインスリン 【RIA】	2	7.40	±	0.00	0.0	2	73.90	±	1.27	1.7
アクセス インスリン 【CLEIA】	2	6.32	±	0.01	0.2	2	68.59	±	5.11	7.4
Abビーズインシュリン '栄研' 【RIA】	1	6.18		0.00	0.0	1	67.07		0.00	0.0
IMx インシュリン・ダイナパック 【EIA】	1	9.50		0.00	0.0	1	88.00		0.00	0.0
LS試薬 '栄研' インスリン 【EIA】	1	11.28		0.00	0.0	1	123.20		0.00	0.0

２）　標準化および標準物質の設定経過

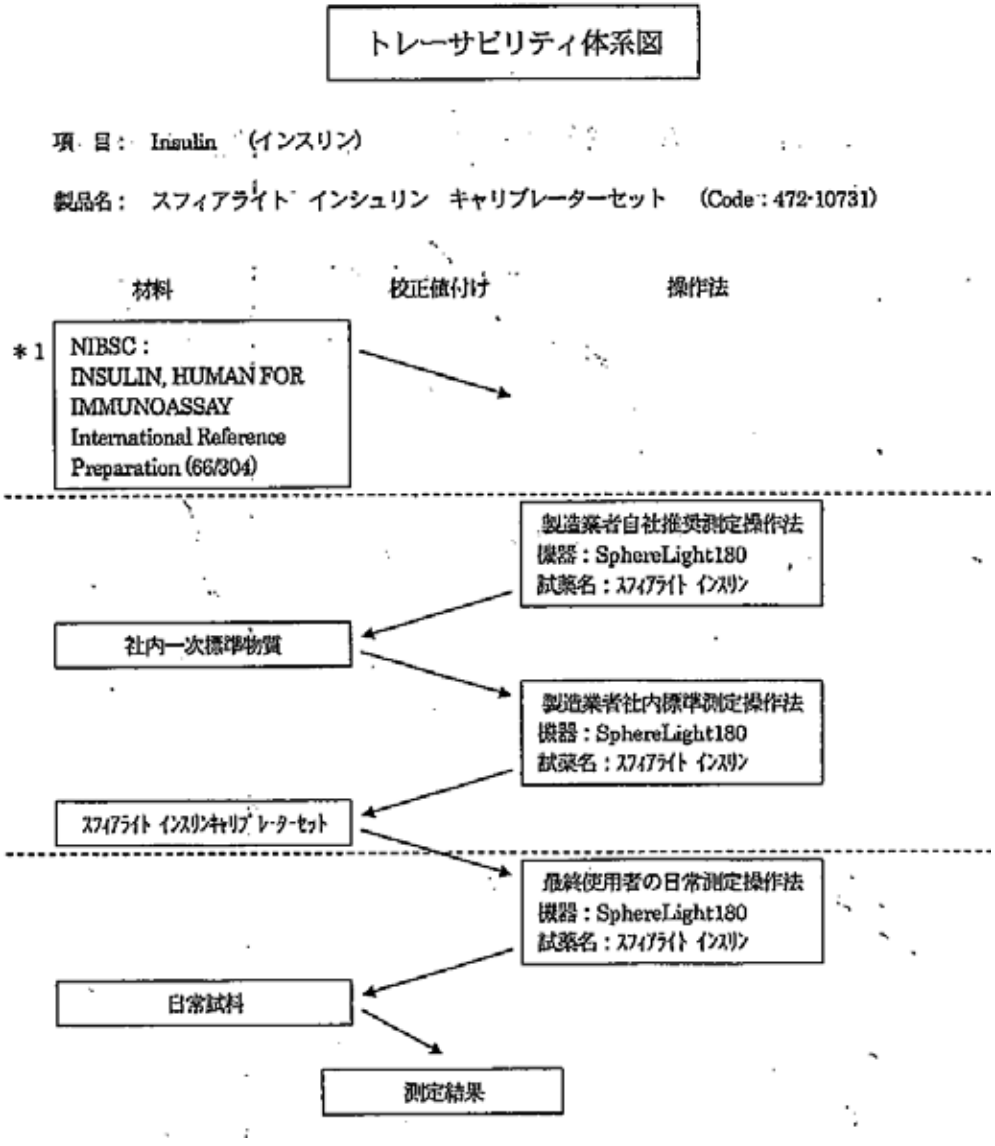
インスリンの測定には､国際標準品として1974年に作製されたInternational Reference Preparation 1stIRP NIBSC code66/304（Human insulin）と 1986 年に作製された International Standard NIBSC code83/500（Insulin crystal）の 2 種類が存在し、95～98％の精製蛋白の入手も可能である。

３）実試料標準物質の設定

① 患者試料および精度管理試料でのキット間差の比較
② 各社のトレーサビリティ体系のアンケート調査
③ 公的標準品としてどのような国際標準品が存在するかの調査
④ 国際標準品（純品）から血清ベースの実試料標準品への値付け方法（基準測操作法：RMP）の選択
⑤ インスリンの治療薬に対する反応性の調査
⑥ 緩衝液ベースおよび血清ベースの実試料標準物質の作製

４）値付けの測定方法の選択

① 各社のトレーサビリティ体系のアンケート調査：三洋化成社から提出されたトレーサビリティ体系を参考資料として添付する。他の企業でも同様の体系で、日常測定操作法を使用して測定値を伝達している事が特徴である。



② 公的標準品としてどのような国際標準品が存在するかの調査：現在インスリン測定試薬を発売している全ての企業が、国際標準品として 1974 年に作製された International Reference Preparation 1stIRP NIBSC code66/304（Human insulin）を使用していた。 1986 年に作製された International Standard NIBSC code83/500（Insulin crystal）も存在するが、International Reference Preparation 1stIRP NIBSC code66/304（Human insulin）との関係が不明である。

③ 国際標準品（純品）から血清ベースの実試料標準品への値付け方法（基準測定操作法：RMP）の選択：各社の日常検査法が使用されている。

④ インスリンの治療薬に対する反応性の調査：インスリンの治療薬が 3 種類あるので、それぞれに対する交差反応性がどの程度あるかについて、各社にアンケート調査を行った。調査結果については、各社が添付文書に記載している内容をまとめるか、記載しないかのどちらかで統一する。

⑤ 緩衝液ベースおよび血清ベースの実試料標準物質の作製：以下に示す。

⑥ 実試料標準品作製の手順

試料は、すべて検体として測定する。

ⅰ　資材の調達

・1974 年に作製された International Reference Preparation 1stIRP NIBSC code66/304（Human insulin）と 1986 年に作製された International Standard NIBSC code83/500（Insulin crystal）の 2 種類を入手し、HECTEF SRC に試料調製を依頼する。
※調整方法および調整後の安定性を調査する。
・血清ベース：インスリンのフリー血清
・緩衝液ベース：PBS ベロナール緩衝液（NIBSC の指定）各社の緩衝液
・ポイント数＆濃度：６ポイント、ゼロ濃度、5、10、50、100、300(uU/mL)
・本数：各社に 1 から 2 本（1 社で 2 試薬)、8 社　計 20 本。
・容器および容量：容器 5mL バイアル、容量 1mL。
・安定化剤＆添加剤：含有しない
・安定性・保管方法：凍結品（保管温度は−80℃)、溶解後の安定性
・値付け作業：HECTEF SRC に委託（調製法に関する情報を全て公開、不確かさも含む）
・値付け方法：マトリックスの影響を受けない測定法、GCMS あるいは IDMS 法（RMP）
・測定回数：5 重測定/測定試薬

ⅱ　相関用患者試料の準備

・JCCLS に新鮮患者血清の入手を依頼
・委員会メンバーからのボランテイアの食前と食 2 時間後（インスリンが高い）の採血
・糖尿病患者ではインスリンが低いので、上記の試料を希釈する
・患者血清はプールしない（個人）の検体を希望
0.3ｍL×8 社　＝約 2.5ｍL 必要
検体の必要最低量の調査　0.3ｍL で 2 重測定
・本数：30 本
・各社の測定レンジ等を確認の上、濃度範囲を報告
・各社のキャリブレータ＆市販コントロール
・CRM470
・ヒト血清試料、実試料標準物質候補品、各社のキャリブレータ、市販コントロール血清および CRM470 の測定(マトリックスの影響を受けない測定法)を HECTEF SRC に依頼

ⅲ　各社での測定

・試薬が複数ある場合には、全ての試薬で参加
・測定機器が複数ある場合には、代表的な機器で参加
・校正は各社の方法で行い、実試料標準物質候補品、コントロール血清および患者試料を検体として測定
・実試料標準物質候補品は 5 重測定、患者試料および市販コントロールはそれぞれ３重測定する。

ⅳ　結果集計

・HECTEF SRC で値付けされた測定値（マトリックスの影響を受けない測定法、GCMS 法など）を基準として、各社の測定結果を百分率で評価する。

・相関係数、回帰式で評価する。

1	公的標準物質 NIBSC の標準物質	 code66/304、code83/500
2	調製液	緩衝液、ﾋﾄ血清ﾍﾞｰｽ
3	ﾎﾟｲﾝﾄ数・濃度	
	ﾎﾟｲﾝﾄ	6
	uU/mL　濃度１	0（uU/mL)
	濃度２	5 (uU/mL)
	濃度３	10 (uU/mL)
	濃度４	50 (uU/mL)
	濃度５	100 (uU/mL)
	濃度６	300 (uU/mL)
4	調製本数・ﾊﾞｲｱﾙ瓶容量・内容量	
	調製本数	20 本
	ﾊﾞｲｱﾙ瓶容量	5mL
	内容量	1mL
5	安定化剤	なし
6	安定性・保管方法	?
	凍結品(-70℃以下)	○
	溶解、融解後	?
7	管理標準検定法	マトリックスの影響を受けない測定法、GCMS 法
8	一次校正物質調製 HECTEF 調製依頼	 ○
9	その他・希望事項	１）HECTEF SRC 製造の場合、スペックと値付けなどの情報開示をお願いしたい。 ２）JSCLS に実試料の依頼、ボランテイア

（２）C-ペプチド

１）測定値の互換性の現状

WG 参加各社から報告された患者試料を用いた相関性成績から判断すると、相関係数は 0.99 以上と極めて良好で、測定値が大きく乖離する症例はない。また、相関回帰式の傾きから、各キット間の測定値差は概ね±10%の範囲内であることが推測される。

報告企業	X 軸	Y 軸	相関係数	傾き	切片	例数	濃度範囲
ｴｽｱｰﾙｴﾙ	栄研(CELIA)	第一(RIA)	0.9910	0.8243	-0.1667?	102	0-25ng/mL
富士ﾚﾋﾞｵ	東ｿｰ(EIA)	富士ﾚﾋﾞｵ(CLEIA)	0.996	0.914	+0.010	99	0-20ng/mL
富士ﾚﾋﾞｵ	東ｿｰ(EIA)	富士ﾚﾋﾞｵ(CLEIA)	0.988	0.918	+0.001	—	0-6ng/mL
三洋化成	東ｿｰ(EIA)	三洋化成(CLEIA)	0.995	1.04	+0.07	63	0-10ng/mL
三洋化成	ｼｵﾉｷﾞ(RIA)	三洋化成(CLEIA)	0.991	1.00	-0.22	63	0-10ng/mL
ﾛｼｭ	東ｿｰ(EIA)	ﾛｼｭ(ECLIA)	0.9991	1.059	+0.310	50	0-30ng/mL
ﾛｼｭ	東ｿｰ(EIA)	ﾛｼｭ(ECLIA)	0.9992	1.095	+0.2588	50	0-30ng/mL
ｶｲﾉｽ		ｶｲﾉｽ(EIA)	0.9898	1.04	+0.04	18	0-12ng/mL
東ｿｰ	ｼｵﾉｷﾞ(RIA)	東ｿｰ(EIA)	0.993	0.9739	-0.0659	—	0-20ng/mL
東ｿｰ	第一(RIA)	東ｿｰ(EIA)	0.996	1.0196	-0.0383	—	0-20ng/mL

第 26 回イムノアッセイ検査　全国コントロールサーベイ（2004 年）成績報告書によると、参加 53 施設において、キット内 CV%は 2 濃度ともに 10%以下でほぼ良好。キット間変動はいずれの試料でも 15～20%前後であった。ツインプロットから測定法間に系統誤差がみられ、標準品の共通化により標準化が期待できる。

(単位：ng/mL)

キット名	試料 A-1				試料 A-2			
	N	Mean	S.D.	C.V.	N	Mean	S.D.	C.V.
ｹﾐﾙﾐ C-ﾍﾟﾌﾟﾀｲﾄﾞ(ｹﾝﾀｳﾙｽ)	12 11	1.32 1.30	0.08 0.06	6.2 4.7	12	6.29	0.18	2.9
C-ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞｷｯﾄ「第一」Ⅲ	11	1.12	0.11	10.3	11	5.40	0.25	4.6
C-ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ ﾘｱ ｼｵﾉｷﾞⅡ	8	1.94	0.17	8.7	8	8.49	0.32	3.8
E ﾃｽﾄ「TOSOH」Ⅱ(C-ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ)	6	1.60	0.08	4.8	6	7.04	0.22	3.2
ST E ﾃｽﾄ「TOSOH」Ⅱ(C-ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ)	6	1.46	0.13	9.0	6	6.85	0.24	3.5
Ab ﾋﾞｰｽﾞ C-ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ ‘栄研’	2	1.35	0.07	5.3	2	6.31	0.01	0.2
ｸｵﾙﾀｽｼﾘｰｽﾞ C-ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ試薬	2	1.61	0.01	0.9	2	7.47	0.05	0.7
DPC･ｲﾑﾗｲｽﾞ C-ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ	2	1.41	0.21	15.0	2	5.98	0.11	1.9
ｽﾌｨｱﾗｲﾄ C-ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ	2	1.88	0.12	6.4	2	8.26	0.09	1.1
LS 試薬 ‘栄研’C-ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ	1	2.01	0.00	0.0	1	7.59	0.00	0.0
ﾙﾐﾊﾟﾙｽ C-ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ	1	1.38	0.00	0.0	1	6.56	0.00	0.0

2）標準化および標準物質の設定経過

C-ペプチドの測定には､国際標準品として 1974 年に作製された International Reference Preparation NIBSC code 84/510 精製蛋白の入手も可能である。

3）実試料標準物質の設定の共同実験

①　入手材料・試薬

品名・商品コード	製造元･販売元	容量	数量	価格
C-peptide 標準品 WHO 84/510	WHO(NIBSC)	10μg/ｱﾝﾌﾟﾙ	1 本	£50?

C-peptide Human　C5057	Sigma	0.25mg　　1 本	¥70,000
ﾍﾞｰｽ血清(C-peputide free Serum)	BiosPacific など	1 本	
参加企業各社測定試薬			¥10,126,120?

相関検討用血清　30 例	各　5 mL?	

② 共同実験用試料の作成

ⅰ ヒト実検体：相関用ヒト実検体を準備する。（委員会メンバーによるボランティア）

ⅱ マトリックス系(A)：ベース血清に WHO 84/510 を溶解（正確に 0.5、3、10、20 ng/mL に調製）

ⅲ マトリックス系(B)ベース血清に C-ペプチド C5057(Sigma)を溶解（0.5、3、10、20 ng/mL に調製）

ⅳ 緩衝液系(A)：WHO 84/510 を BSA 加緩衝液(※1)で 2μg/mL に調製

ⅴ 緩衝液系(B)：C-ペプチド C5057(Sigma)を BSA 加緩衝液(※1)で 2μg/mL に調製

※1 組成：0.1% BSA, 0.5% lactose, PBS

容量・本数および容器

① ヒト実検体：0.3mL×30 例×9 社+α	P.P.容器?
② マトリックス系(A) ：1.0mL×4 濃度×9 社＋α	ｶﾞﾗｽﾊﾞｲｱﾙ or P.P.容器
③ マトリックス系(B) ：1.0mL×4 濃度×9 社＋α	ｶﾞﾗｽﾊﾞｲｱﾙ or P.P.容器
④ 緩衝液系(A)：1.0mL×1 濃度×9 社＋α	ｶﾞﾗｽﾊﾞｲｱﾙ or P.P.容器
⑤ 緩衝液系(B)：1.0mL×1 濃度×9 社＋α	ｶﾞﾗｽﾊﾞｲｱﾙ or P.P.容器

保管条件：凍結（-80℃）

③ 共同実験

・試料①は 2 重測定する。
・試料②、③は 5 重測定する。
・試料④、⑤は各社のベース緩衝液を用いて 0.5、3、10、20 ng/mL に調製し、5 重測定する。
・試料調製に用いたベース血清および BSA 加緩衝液を 2 重測定する。
・参加各試薬のキャリブレータを 2 重測定する。
・校正は各社の方法で実施し、上記試料の測定値を報告する。

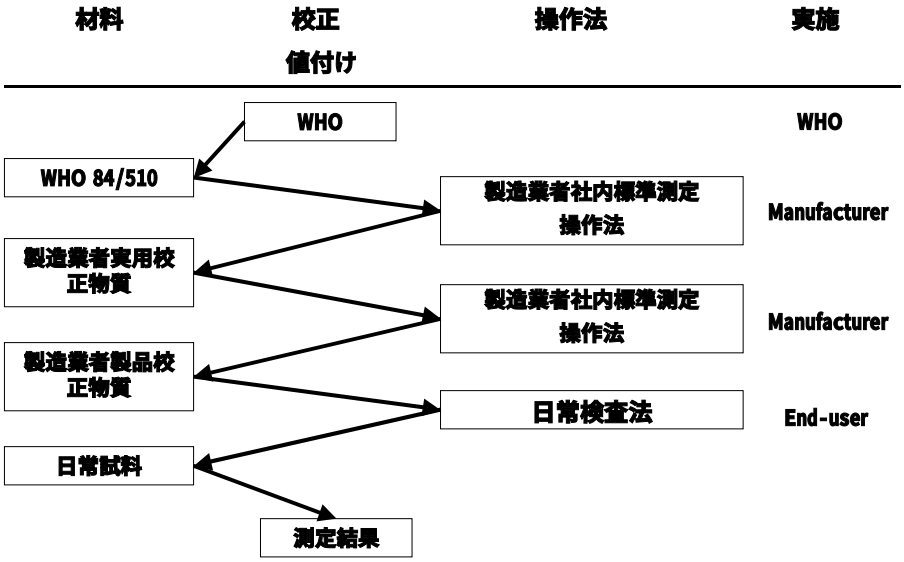
④ 実試料標準物質の作成プロトコルの検討

③の共同実験成績」をもとに実試料標準物質の仕様を作成する。

4）値付けの測定方法の選択

トレーサビリティ体系のアンケート調査では、各社同様の体系であり、一次標準物質としては WHO 84/510 を用い、社内の標準測定法により値の伝達がなされている。

各社の校正のトレーサビリティ体系図：C-ペプチド



（3）コルチゾール

1）測定値の互換性の現状

各社から報告された相関性データをみると、相関係数は 0.94～0.98 の範囲に、相関回帰式の傾きは 0.83～1.02 の範囲にある。

また、各社の添付文書に記載された相関係数は 0.94～0.98 の範囲に、相関回帰式の傾きは 0.83～1.2 の範囲にあり良好な成績ではあるが。相関係数および傾きから判断するとキット間差は±10%は超えると考えられる。

報告企業	X軸	Y軸	相関係数	傾き	切片	例数	濃度範囲 (ug/dL)
ｶｲﾉｽ		ｸｵﾙﾀｽ (EIA)	0.9645	0.92	＋1.07	46	0～30
東ｿｰ	TDX	ST Eﾃｽﾄ II (EIA)	0.984	0.967	＋0.841	22	0～30
	ｶﾞﾝﾏｰ･ｺｰﾄ (RIA)	ST Eﾃｽﾄ II (EIA)	0.9495	1.0272	－0.698		0～30
	TFB (RIA)	ST Eﾃｽﾄ II (EIA)	0.939	1.008	＋.839	31	0～25
日本ｼｪｰﾘﾝｸﾞ	第一ｽﾊﾟｯｸ (RIA)	ｶﾞﾝﾏｰ･ｺｰﾄ (RIA)	0.973	0.94	＋0.38	86	0～30
	栄研 (RIA)	ｶﾞﾝﾏｰ･ｺｰﾄ (RIA)	0.964	0.83	＋0.58	78	0～30

添付文書	X軸	Y軸	相関係数	傾き	切片	例数	濃度範囲 (ug/dL)
栄研化学	(RIA)	栄研 (RIA)	0.939	1.22	－4.31	39	
ｵｰｿ･ｸﾘﾆｶﾙ･ﾀﾞｲｱｸﾞﾉｽﾃｨｯｸｽ	(FPIA)	ﾋﾞﾄﾛｽ (CLEIA)	0.951	0.80	＋0.77	100	
	(EIA)	ｸｵﾙﾀｽ (EIA)	0.982	0.995	＋0.003	76	
日本ｼｪｰﾘﾝｸﾞ	(RIA)	ｶﾞﾝﾏｰ･ｺｰﾄ (RIA)	0.973	0.94	＋0.38	86	
	(RIA)	ｶﾞﾝﾏｰ･ｺｰﾄ (RIA)	0.964	0.83	＋0.58	78	
日本ﾋﾞｵﾒﾘｭｰ	(FPIA)	ﾊﾞｲﾀﾞｽ(CLEIA)	0.94	1.06	＋1.45	158	
ﾍﾞｯｸﾏﾝ･ｺｰﾙﾀｰ	(FPIA)	ｱｸｾｽ (CLEIA)	0.975	0.93	＋2.4	148	
	(CLEIA)	ｱｸｾｽ (CLEIA)	0.964	0.988	－0.163	48	
ﾛｼｭ･ﾀﾞｲｱｸﾞﾉｽﾃｨｯｸｽ	(EIA)	ｴｸﾙｰｼｽ (ECLIA)	0.977	1.05	－15.11	71	

2004 年に実施された 26 回イムノアッセイ検査全国コントロールサーベイ成績報告によると、RIA 法 16 施設、non－RI 法は 33 施設の参加があり、RIA 法は 5 種類、non-RIA 法は 8 種類が使用された。キット内 CV%は 2 濃度とも 7～13%であり、キット間 CV%は試料 1 で 11.9%、試料 2 で 6.5%であった。一昨年指摘されたプレクリニカルクッシング症候群の診断基準付近のレベルの試料 1 は、1.75～4.93 ug/dL と前回（2003 年）より測定値にばらつきがみられた。

２）標準化および標準物質の設定経過

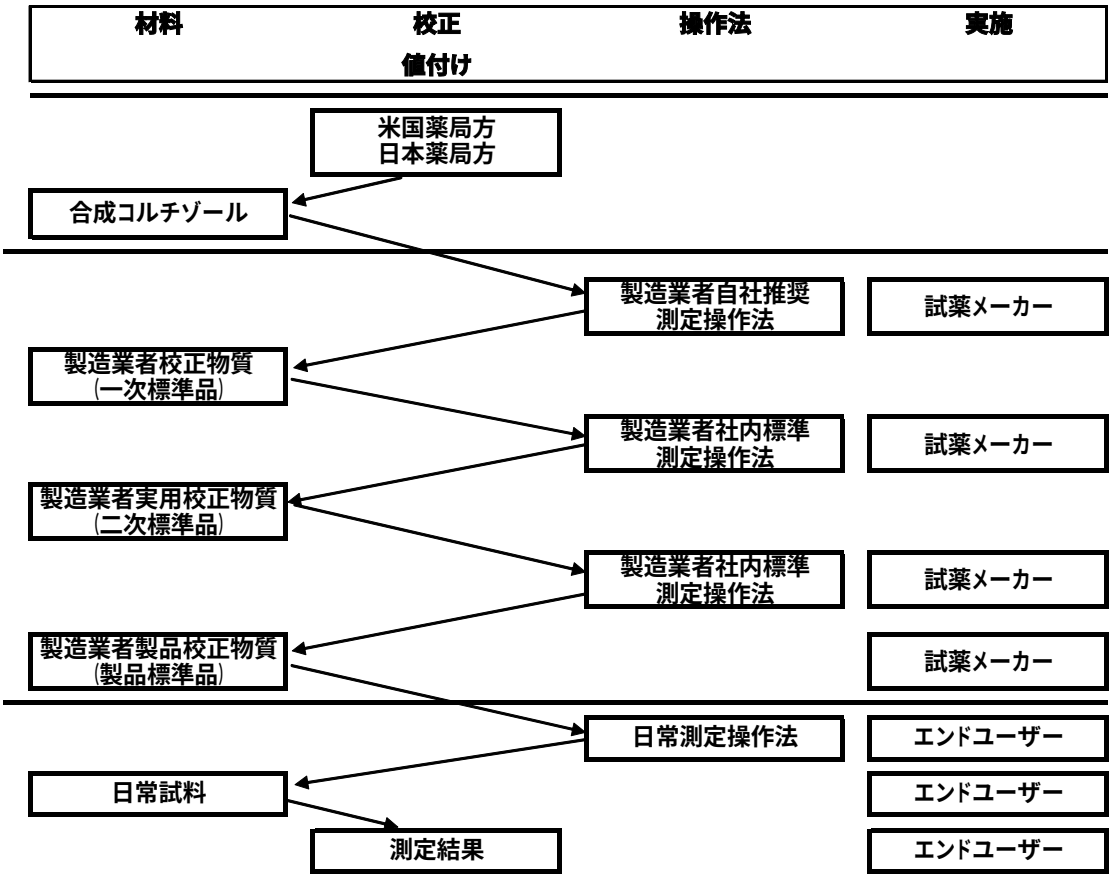
コルチゾールの測定には、国際標準品は設定されていない。純品として NIST SRM 921 がある。また IRMM から血清標準物質として ERM DA-192 および DA-193 とパネル血清 34 種の DA-451 があり、入手も可能である。

３）実試料標準物質の設定

アンケート調査によると、各社のトレーサビリティは同様の体系であり、社内の標準測定操作法を使用している。トレーサビリティ体系図を参考として示す。

販売元	キット名	校正 値付け
栄研化学	ｺﾙﾁｿﾞｰﾙ‘栄研’	日本薬局方
日本ｼｪｰﾘﾝｸﾞ	ｶﾞﾝﾏｰ・ｺｰﾄ ｺﾙﾁｿﾞｰﾙ	米国薬局方
ﾍﾞｯｸﾏﾝ・ｺｰﾙﾀｰ	ｱｸｾｽ ｺﾙﾁｿﾞｰﾙ	米国薬局方
ﾛｼｭ･ﾀﾞｲｱｸﾞﾉｽﾃｨｯｸｽ	ｴｸﾙｰｼｽ試薬 ｺﾙﾁｿﾞｰﾙ	ID-GCMS

【トレーサビリテイ体系体系図】



4）値付けの測定方法の選択

① 評価用試料の留意事項

i 基準範囲下限 10ug/dL、上限 30ug/dL

ii 副腎性プレクリニカルクッシング症候群の判定基準の濃度域 1ug/dL および 3ug/dL

キット名	参考基準範囲 (ug/dL)
ｺﾙﾁｿﾞｰﾙ'栄研'	23.9以下
ﾋﾟﾄﾛｽ ｺﾙﾁｿﾞｰﾙ	4.46～22.7
ｸｵﾙﾀｽ ｺﾙﾁｿﾞｰﾙ	3.9～18.1
ｱﾚｸﾞﾛﾗｲﾄ ｺﾙﾁｿﾞｰﾙ	3,5～26.0
ST Eﾃｽﾄ｢TOSOH｣ II (ｺﾙﾁｿﾞｰﾙ)	10.4～26.4
ｶﾞﾝﾏｰ･ｺｰﾄ ｺﾙﾁｿﾞｰﾙ	
ﾊﾞｲﾀﾞｽ ｱｯｾｲｷｯﾄ CORTISOL	6.0～28.5
ｱｸｾｽ ｺﾙﾁｿﾞｰﾙ	6.7～22.6
ｴｸﾙｰｼｽ試薬 ｺﾙﾁｿﾞｰﾙ	6.2～19.4

② 資材調達

i 公的標準品として IRMM BCR192、および BCR193 を入手

ii　公的標準品として IRMM/IFCC-451 を入手

iii　純物質として NIST SRM921 を入手

iv　純物質として SIGMA H4001 を入手　　・・・純度など産総研で確認

v　ベース血清としてステロイドフリー血清を入手

※安定化剤、添加剤：含有する

vi　緩衝液ベース：PBS

品名-商品コード	製造元･販売元	性状	物質量	容量･容器	数量	
BCR－192	IRMM	血清･FD	98.8±2.0 ug/L (273±6 nmol/L)	1.25mL･ｱﾝﾌﾟﾙ	1本	蒸留水溶解
BCR－193	IRMM	血清･FD	277±5 ug/L (763±14	1.25mL･ｱﾝﾌﾟﾙ	1本	蒸留水溶解
IFCC－451	IRMM	血清･F	34ﾊﾟﾈﾙ 83～764 nmol/L	各1mL･ﾊﾞｲｱﾙ	34本	ｼﾝｸﾞﾙ･ﾄﾞﾅｰ ID-GCMSと比較
SRM－921	NIST	PW･98%	m.w.363	1g	1本	nmol ｺﾙﾁｿﾞｰﾙ/L ＝ug/100mL×27.59
Hydrocortisone-H4001	SIGMA			1g	1本	
ｽﾃﾛｲﾄﾞﾌﾘｰ血清-P210000	BiosPacific				1本	

③ 共同実験用の試作標準品の調製

i　血清ベースの実試料標準物質の作製

※緩衝液系は準備しない

ii　標準試料は正確に 1、3、10、30、60ug/dL に調製

※値付け方法：マトリックスの影響を受けない測定法　ID-GC/MS

※安定性・保管方法：凍結品（保管温度は－80℃、溶解後の安定性)、調整後の安定性を調査

④ 評価用試料の準備

i　IRMM　IFCC-451:34 パネル

ii　IRMM　BCR-192:1 濃度

iii　IRMM　BCR-193：1 濃度

iv　マトリックス系（A）：ベース血清に SRM-921 を溶解（1、3、10、30、60ug/dL に調製）

v　マトリックス系（B）：ベース血清に SIGMA　H4001 を溶解（1、3、10、30、60ug/dL に調製）

vi　1ug/dL 以下の血清試料(A)　：健常者ボランティア　5 名へ（デキサメサゾン 1mg 負荷）

vii　3ug/dL 以下の血清試料（B）：健常者ボランティア　5 名へ（デキサメサゾン 8mg 負荷）

※vi および vii は JCCLS に新鮮血清試料の入手を依頼

※相関用患者試料は準備しない

※試料の必要最低量、 予備試料の準備？

⑤ 各社のキット(装置)で測定

i　試料ⅰ、ⅱ、ⅲは 3 重測定

ii　試料ⅳ、ⅴは 5 重測定

iii　試料ⅵ、ⅶは 3 重測定

iv　試料ⅳ、ⅴの調製に用いたベース血清は 3 重測定

※各社のキャリブレータは測定しない。

評価用試料	種類	容量	本数	測定数	容器
IRMM IFCC-451	34例	0.3mL	9社×各1本	3重測定	ｶﾞﾗｽﾊﾞｲｱﾙ又はﾌﾟﾗｽﾁｯｸ容器？
IRMM BCR-192	1濃度	0.3mL	9社×各1本	3重測定	ｶﾞﾗｽﾊﾞｲｱﾙ又はﾌﾟﾗｽﾁｯｸ容器？
IRMM BCR-193	1濃度	0.3mL	9社×各1本	3重測定	ｶﾞﾗｽﾊﾞｲｱﾙ又はﾌﾟﾗｽﾁｯｸ容器？
ﾏﾄﾘｯｸｽ系(A) SRM-921	5濃度	1mL	9社×各1本	5重測定	ｶﾞﾗｽﾊﾞｲｱﾙ又はﾌﾟﾗｽﾁｯｸ容器？
ﾏﾄﾘｯｸｽ系(B) SIGMA H4001	5濃度	1mL	9社×各1本	5重測定	ｶﾞﾗｽﾊﾞｲｱﾙ又はﾌﾟﾗｽﾁｯｸ容器？
ﾎﾞﾗﾝﾃｨｱ ﾃﾞｷｻﾒｻｿﾞﾝ 1mg	5名	0.5mL	9社×各1本	3重測定	ｶﾞﾗｽﾊﾞｲｱﾙ又はﾌﾟﾗｽﾁｯｸ容器？
ﾎﾞﾗﾝﾃｨｱ ﾃﾞｷｻﾒｻｿﾞﾝ 8mg	5名	0.5mL	9社×各1本	3重測定	ｶﾞﾗｽﾊﾞｲｱﾙ又はﾌﾟﾗｽﾁｯｸ容器？
ﾍﾞｰｽ血清 BiosPacific	1種類	1mL	9社×各1本	5重測定	ｶﾞﾗｽﾊﾞｲｱﾙ又はﾌﾟﾗｽﾁｯｸ容器？

⑥ 結果集計

ⅰ　校正は各社の方法で実施し、上記試料の測定値を報告する

ⅱ　値付けされた測定値（マトリックスの影響を受けない測定法　ID-GC/MS）を基準として、各社の測定結果を評価する。

⑦ 実試料標準物質の作製プロトコルの検討

共同実験成績をもとに実試料標準物質の仕様を作成する。

５．実試料標準物質作製プロトコル

（１）トレーサビリテイシステム

SI 単位系を最上位に位置づける体系とした。

（２）血清の性状規格

血清の性状については、安定性、ロット間の継承の確認も含めて、今後確立する。

（３）基準測定操作法

今後設定する。

（４）値付けの手順

今後設定する。

（５）認証値と不確かさ

今後設定する。

６．今後の課題

平成 17 年度の研究において、実試料標準物質の候補品の選択を行った。

平成 18 年度は、これまでの結果を基に実試料標準物質候補品作製のための本格的な作業を行う。実試料標準物質候補品での収束性の再検証の確認をした後に、実試料標準物質とし、作製のプロ

トコルの作業を行う。

７．結び

平成 17 年度の作業において、実試料標準物質の候補品の選択を行い、その後の作業の方向性を定めた。平成 18 年度は残る課題を推し進め、実試料標準物質の作製プロトコルを完成させる。

２－２－３－１０　HDL-コレステロール、LDL-コレステロール

要旨

１）血清 HDL－コレステロール（HDL-C)、血清 LDL－コレステロール（LDL-C）の測定について、市販試薬におけるデータの収束性を可能にするための HDL-C 及び LDL-C の実試料系標準物質の作製について検討した。

２）測定試薬を販売しているメーカーを中心にワーキンググループを設け、試薬、キャリブレーター、トレーサビリティ等の調査をした上で、実試料系標準物質候補を探索する目的で、各メーカー使用のキャリブレーター、コントロール及び検討中の試料も含めて各メーカー試薬と組み合わせた場合の測定値収束性の効果を調査した。

３）実試料標準物質の候補品については、HDL-C では HECTEF SRC/NCCLS 処方/HDL-C 中濃度、LDL-C では HECTEF SRC/NCCLS 処方/LDL-C 低濃度が選択された。

４）平成 18 年度は、実試料系標準物質候補品についてプロトタイプを作成する。併せて実試料系標準物質候補品での測定値収束性の再検証の確認をした後に、血清の性状規格、基準測定操作法、値付けの手順、認証値と不確かさ等も含めて実試料系標準物質の作製プロトコルを完成させる。

１．目的

本実試料項目群、J1（HDL－コレステロール、LDL－コレステロール）では、血清HDL－コレステロール及びLDL－コレステロールの実試料系標準物質の作製を行い、市販試薬におけるデータの収束性を可能にすることを目的とする。

２．委員会の構成

本委員会は、実試料系標準物質項目群の柱１ J1・WGで、メンバーの構成を下記に記す。

委員長	櫻林　郁之介（自治医科大学）
アドバイザー	濱崎　直孝（九州大学）
	桑　克彦（筑波大学）
	森下　芳孝（三重大学）
	中村　雅一（大阪府立健康科学センター）
委員	山下　章吾（アークレイ（株)）
	樋渡　亮二（オーソ・クリニカルダイアグノステイックス（株)）
	大和　隆(協和メデックス（株））
	三池　彰（協和メデックス（株)）
	岸　　浩司（シスメックス（株)）
	芳村　一（(株）シノテスト）
	根占　哲也（(株)セロテック）
	齋藤　和典（第一化学薬品（株)）
	斉藤　憲祐（デイドベーリング（株)）
	上村　武司（テクノメデイカ（株)）

伊藤　康樹（デンカ生研（株））
松井　寛史（デンカ生研（株））
田口　路比呂（(株)ビーエムエル）
牧内　肇(富士写真フィルム（株））
横田　敦子（ベックマン・コールター（株））
吉海　毅（ロシュ・ダイアグノステイックス（株））
花田　寿郎（和光純薬工業（株））
事務局　藤橋　和夫（日本臨床検査標準協議会）

３．委員会の開催

第 1 回会合　2005 年 10 月 21 日（金）13:30～15:30（臨床検査薬協会会議室）
第 2 回会合　2005 年 11 月 25 日(金)15：00～16：30（TCAT 会議室）
責任者会議　2006 年 1 月 27 日(金)15:30～16:30（臨床検査薬協会会議室）
第 3 回会合　2006 年 2 月 3 日（金）15：00～17：00(臨床検査薬協会会議室)
第 4 回会合　2006 年 3 月 14 日（火）15：00～17：00（臨床検査薬協会会議室）

４．標準物質の設定概要

（１）測定値の互換性の現状

各社の市販キット、キャリブレーター、トレーサビリテイ体系、実試料標準物質に望まれる性状、品質等の調査を行った。その結果、HDL-C で 14 社（ドライケミストリを含む)、LDL-C で 11 社が販売しており、トレーサビリティ体系については CDC の基準測定法からの継承が最も多かった。これらの現状を踏まえて、第２回会合においては、

- 市販キットの互換性の調査
- 市販キャリブレーター、コントロールを実試料標準物質候補とした場合の血清測定値収束性の効果
- HECTEF SRC(スタンダードレファレンスセンター)開発品、及び A 社　開発品（No.20、No.114）による血清測定値の収束性の効果

について比較試験を行うこととした。

2006 年 1 月 17,18 日に HDL-C については 10 社 11 試薬、LDL-C については、10 社 10 試薬を用いビーエムエル(株)の日立 7170 形自動分析装置にて、プロトコルに従い実施し検証した。

なお、今回は予備試験との位置付けで、専用機器用試薬についても、汎用機器である日立 7170 形自動分析装置で測定した。

市販キットの互換性の現状は、HDL-C においては各キット同士の相関係数は概ね 0.99 以上であり、LDL-C においても 0.98 以上であった。一方、各社の血清測定値の平均値で全体の収束度をみると（平均値と SD）、HDL-C で平均値 69.52mg/dL、SD5.88mg/dL、LDL-C で平均値 122.3mg/dL、SD4.86mg/dL となった。

また、各社キャリブレーター、コントロール、HECTEF SRC 及び A 社から提供された候補品（No.20、NO.114）を各社キャリブレーターとして用いた場合の収束度では、HDL-C においては HECTEF SRC／NCCLS 処方／中濃度で最も収束性が良く、次いで No. 6 の市販キャリブレー

ターの順であった。LDL-C においても同様に No.105、No.101 のキャリブレーターであった。

上記の統一のキャリブレーターを用いることにより、HDL-C での平均値と SD による収束度は、SD として、各社キャリブレーターでの結果 5.88mg/dL から HECTEF SRC／NCCLS 処方／中濃度で 0.91mg/dL に、No. 6 のキャリブレーターで 1.62mg/dL であった。一方、LDL-C においても同様に、各社キャリブレーター使用時の SD4.86mg/dL に対して、No.105 のキャリブレーターで 3.28mg/dL、No.101 のキャリブレーターで 3.93mg/dL、HECTEF　SRC／NCCLS 処方／中濃度で 5.69mg/dL であった。

なお、血清相関に対する相対残差についても、各社キャリブレーター、候補品で比較した結果も、同様な傾向であった。

また、別途ドライケミストリー３試薬で HDL-C についてのみ同様な検証を行った結果、HECTEF　SRC／NCCLS 処方／低濃度、HECTEF　SRC／NCCLS 処方／中濃度の順に収束がみられた。先に行った液状試薬での一斉分析においても、HECTEF　SRC／NCCLS 処方／中濃度の収束度が最も良好であった。

以上の結果から、HDL-C、LDL-C ともに HECTEF　SRC／NCCLS 処方／中濃度を候補品の１つとして選択することとした。

（２）標準化および標準物質の設定経過

（１）の結果を基に討議した結果、NO.6、No.101、No.105 のキャリブレーターは凍結乾燥品であるために、値付けに用いる方法として候補に挙がっている超遠心法を用いる方法（CDC 基準測定法：UCMH 法、BQ 法）においては比重の関係から値付けが困難との意見が大多数であったため、５－１の検証で次に収束性が良好であった HECTEF SRC／NCCLS 処方／HDL-C 中濃度、LDL-C 低濃度を候補品の１つとして設定した。

但し、候補品の性状を明らかにした上で、次の検討に進むこととした。

なお、凍結乾燥品での実試料標準物質候補品については、今後の検討結果を待つこととした。

（３）実試料標準物質の設定

（２）の結果を踏まえ、実試料標準物質候補品を用い、各社試薬での互換性の検証を各社の標準操作法で実施し、妥当性の確認が得られた場合に設定する。

（４）値付けの測定方法の選択

CDC 基準測定法（HDL-C：UCMH 法または DCM 法、LDL-C：BQ 法）とする。

５．実試料標準物質作製プロトコル

（１）トレーサビリテイシステム

ＳＩ単位系を最上位に位置づける体系とした。

（２）血清の性状規格

血清の性状については、安定性、ロット間の継承の確認も含めて、今後確立する。

（3）基準測定操作法

今後設定する。

（4）値付けの手順

今後設定する。

（5）認証値と不確かさ

今後設定する。

6．今後の課題

平成 17 年度の研究において、実試料標準物質の候補品を選択し、かつプレ検証試験も行い、その有用性について確認した。

平成 18 年度は、これまでの結果を基に実試料標準物質候補品作製のための本格的な作業を行う。実試料標準物質候補品での収束性の再検証の確認をした後に、実試料標準物質とし、作製のプロトコルの作業を行う。

7．結び

平成 17 年度の作業において、HDL-C、LDL-C 実試料標準物質の候補品の選択を行い、その後の作業の方向性を定めた。平成 18 年度は残る課題を推し進め、実試料標準物質の作製プロトコルを完成させる。

＜添付資料＞

比較試験結果報告書

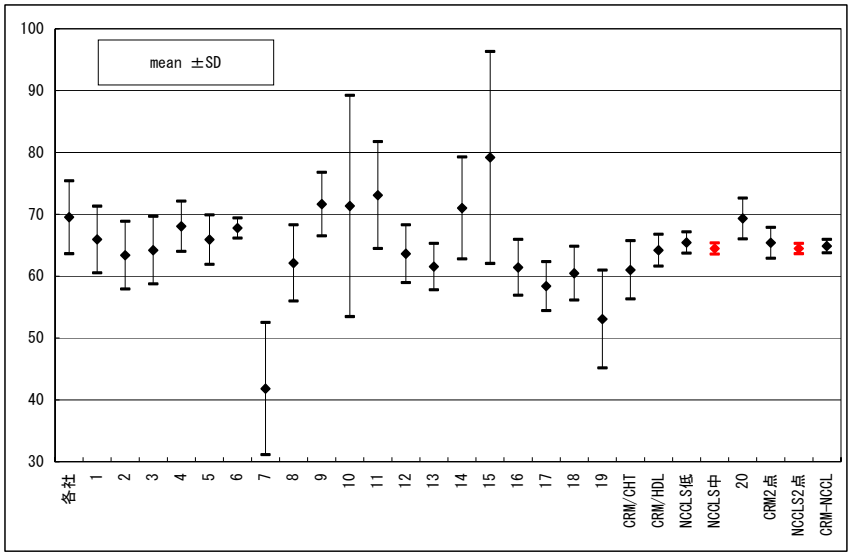
トレーサビリティ体系図

ＨＤＬ
キャリブレーションに用いる標準を変更した場合の、血清実測値（n=56）の変動

１．測定値平均の変動

(mg/dL)

標準	mean	SD
各社	69.52	5.88
1	65.93	5.39
2	63.39	5.48
3	64.21	5.46
4	68.05	4.07
5	65.91	4.00
6	67.78	1.62
7	41.82	10.69
8	62.12	6.16
9	71.63	5.14
10	71.35	17.88
11	73.10	8.63
12	63.63	4.67
13	61.56	3.76
14	71.01	8.24
15	79.18	17.12
16	61.42	4.52
17	58.39	3.97
18	60.48	4.34
19	53.06	7.90
CRM/CHT	61.01	4.71
CRM/HDL	64.19	2.58
NCCLS低	65.44	1.72
NCCLS中	64.47	0.91
20	69.31	3.31
CRM2点	65.39	2.50
NCCLS2点	64.46	0.85
CRM-NCCL	64.86	1.09

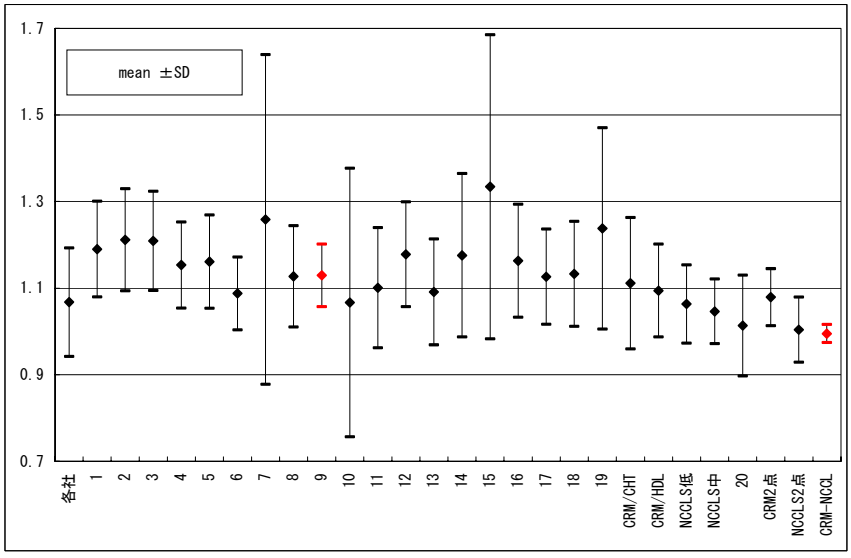


標準品･ｺﾝﾄﾛｰﾙ･一次標準の番号は、各社の製品および候補品。

２．試薬Ｆ測定値をｘ軸とした際の、回帰式傾きの変動

回帰式傾き

標準	mean	SD
各社	1.068	0.125
1	1.190	0.111
2	1.212	0.118
3	1.209	0.115
4	1.153	0.099
5	1.161	0.108
6	1.088	0.084
7	1.259	0.381
8	1.127	0.117
9	1.129	0.072
10	1.067	0.310
11	1.101	0.139
12	1.178	0.121
13	1.091	0.122
14	1.176	0.189
15	1.334	0.351
16	1.163	0.131
17	1.126	0.110
18	1.133	0.121
19	1.238	0.232
CRM/CHT	1.111	0.152
CRM/HDL	1.094	0.107
NCCLS低	1.063	0.090
NCCLS中	1.046	0.075
20	1.013	0.116
CRM2点	1.079	0.066
NCCLS2点	1.004	0.075
CRM-NCCL	0.995	0.021



標準品･ｺﾝﾄﾛｰﾙ･一次標準の番号は、各社の製品および候補品。

ＨＤＬ　標準：各社標準

第一試薬をｘ軸とする血清回帰式に対する相対残差　(mg/dL)

		測定試薬											残差		残差絶対値		測定平均値	
		試薬Ａ	試薬Ｂ	試薬Ｃ	試薬Ｄ	試薬Ｅ	試薬Ｆ	試薬Ｇ	試薬Ｈ	試薬Ｉ	試薬Ｊ	試薬Ｋ	平均	ＳＤ	平均	ＳＤ	平均	ＳＤ
標準	1	-15.6%	-18.2%	-18.1%	-17.5%	-21.2%	0.0%	1.7%	-23.0%	-10.3%	-19.1%	-18.4%	-14.5%	8.3%	14.8%	7.6%	65.93	5.39
	2	-17.6%	-20.3%	-20.2%	-19.7%	-21.3%	0.0%	0.8%	-26.1%	-11.7%	-20.2%	-20.8%	-16.1%	8.8%	16.3%	8.5%	63.39	5.48
	3	-16.7%	-20.2%	-20.2%	-20.1%	-22.2%	0.0%	0.3%	-25.0%	-12.0%	-19.1%	-19.9%	-15.9%	8.6%	16.0%	8.5%	64.21	5.46
	4	-11.8%	-14.3%	-14.6%	-11.0%	-14.7%	0.0%	2.3%	-15.6%	-10.7%	-13.8%	-14.5%	-10.8%	6.1%	11.2%	5.3%	68.05	4.07
	5	-13.3%	-15.7%	-15.2%	-10.8%	-14.3%	0.0%	0.3%	-18.6%	-9.2%	-15.6%	-14.3%	-11.5%	6.3%	11.6%	6.2%	65.91	4.00
	6	-4.9%	-5.0%	-4.2%	-3.7%	-8.0%	0.0%	-1.8%	-8.2%	-5.5%	-6.3%	-8.1%	-5.1%	2.6%	5.1%	2.6%	67.78	1.62
	7	24.1%	17.7%	24.8%	-31.1%	-27.9%	0.0%	-0.5%	9.4%	-53.8%	27.3%	-23.1%	-3.0%	27.2%	21.8%	15.1%	41.82	10.69
	8	2.8%	0.9%	2.2%	-24.1%	-20.7%	0.0%	2.3%	-10.6%	-14.7%	2.3%	-16.4%	-6.9%	10.5%	8.8%	8.8%	62.12	6.16
	9	-12.5%	-13.0%	-12.1%	-18.2%	-14.2%	0.0%	-0.7%	-17.6%	-6.9%	-13.5%	-11.5%	-10.9%	6.0%	10.9%	6.0%	71.63	5.14
	10	50.0%	30.2%	34.8%	-25.6%	-10.6%	0.0%	2.0%	-1.0%	-25.8%	49.6%	10.8%	10.4%	27.3%	21.9%	18.4%	71.35	17.88
	11	8.4%	-0.6%	0.9%	-26.8%	-17.8%	0.0%	1.3%	-20.8%	-5.6%	3.5%	-5.7%	-5.7%	11.2%	8.3%	9.3%	73.10	8.63
	12	-15.3%	-18.1%	-18.7%	-13.6%	-16.2%	0.0%	1.9%	-19.3%	-8.9%	-18.2%	-14.5%	-12.8%	7.4%	13.2%	6.7%	63.63	4.67
	13	-4.9%	-9.8%	-9.7%	-7.9%	-6.4%	0.0%	1.7%	-14.1%	8.6%	-9.0%	-6.8%	-5.3%	6.4%	7.2%	3.9%	61.56	3.76
	14	-18.8%	-23.9%	-23.2%	-6.1%	-7.3%	0.0%	0.0%	-16.5%	0.0%	-21.6%	-3.9%	-11.0%	9.8%	11.0%	9.8%	71.01	8.24
ｺﾝﾄﾛｰﾙ	15	-21.0%	-27.7%	-28.0%	2.5%	-5.9%	0.0%	1.5%	-24.1%	-13.7%	-23.0%	-11.2%	-13.7%	11.8%	14.4%	10.8%	79.18	17.12
	16	-14.3%	-16.4%	-17.7%	-10.9%	-15.0%	0.0%	1.5%	-19.2%	-4.4%	-18.3%	-10.9%	-11.4%	7.3%	11.7%	6.9%	61.42	4.52
	17	-14.2%	-12.1%	-12.1%	-14.5%	-17.1%	0.0%	0.5%	-14.9%	-1.6%	-15.0%	-1.2%	-9.3%	7.1%	9.4%	6.9%	58.39	3.97
	18	-12.2%	-15.7%	-16.5%	-2.7%	-7.1%	0.0%	3.0%	-5.6%	-9.7%	-15.2%	-9.7%	-8.3%	6.5%	8.9%	5.7%	60.48	4.34
	19	-22.8%	-28.9%	-28.6%	-1.4%	-6.8%	0.0%	1.7%	-15.9%	-10.5%	-25.2%	-14.9%	-13.9%	11.4%	14.3%	11.0%	53.06	7.90
一次標準	CRM/CHT	-2.7%	-4.3%	-4.3%	-8.2%	-7.5%	0.0%	0.5%	-10.1%	5.4%	-7.3%	-7.2%	-4.1%	4.6%	5.2%	3.2%	61.01	4.71
	CRM/HDL	-7.3%	-6.9%	-6.7%	-4.9%	-9.7%	0.0%	-0.4%	-9.7%	0.3%	-7.2%	-5.5%	-5.3%	3.7%	5.3%	3.6%	64.19	2.58
	NCCLS低	-0.4%	0.2%	1.8%	-5.0%	-6.1%	0.0%	-2.1%	-0.7%	-4.8%	1.4%	-5.5%	-1.9%	2.9%	2.5%	2.3%	65.44	1.72
	NCCLS中	-1.0%	-1.8%	-1.1%	-2.7%	-3.2%	0.0%	0.6%	-3.0%	-0.3%	-0.6%	-4.0%	-1.6%	1.5%	1.7%	1.4%	64.47	0.91
	20	3.8%	4.3%	3.5%	3.7%	4.2%	0.0%	0.9%	6.4%	8.1%	5.1%	3.6%	4.0%	2.2%	4.0%	2.2%	69.31	3.31

標準品・ｺﾝﾄﾛｰﾙ・一次標準の番号は、各社の製品および候補品。

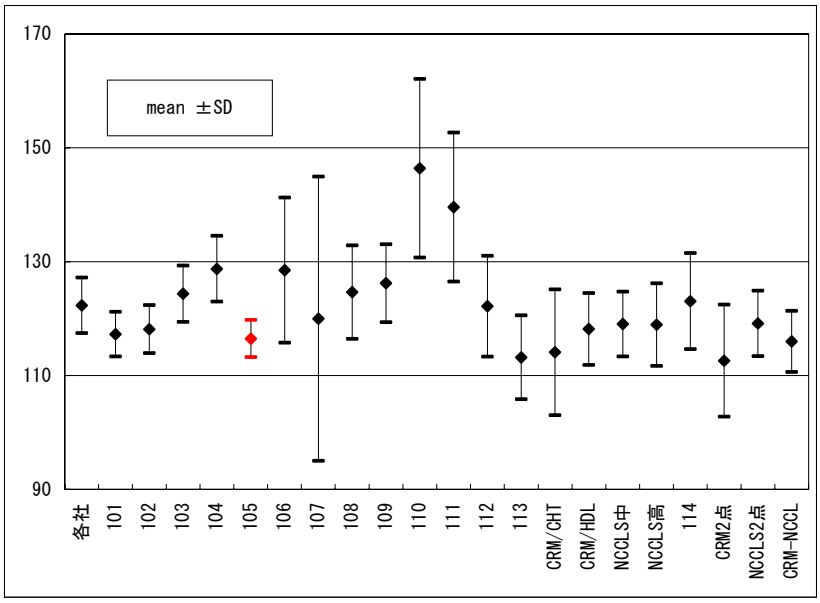
ＬＤＬ

キャリブレーションに用いる標準を変更した場合の、血清実測値（n=56）の変動

１．測定値平均の変動

(mg/dL)

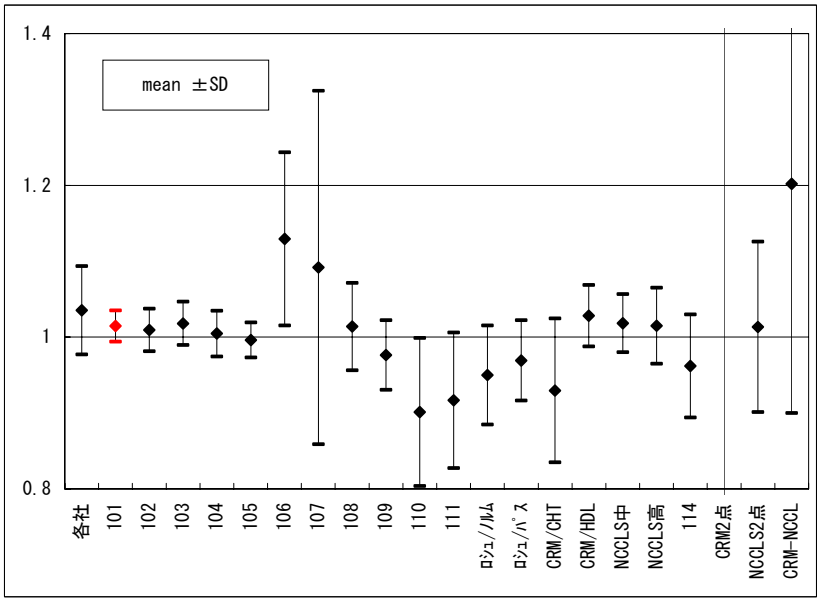
標準	mean	SD
各社	122.31	4.86
101	117.24	3.93
102	118.13	4.24
103	124.35	4.96
104	128.74	5.77
105	116.48	3.28
106	128.50	12.74
107	120.00	24.97
108	124.62	8.22
109	126.21	6.83
110	146.41	15.69
111	139.60	13.10
112	122.16	8.85
113	113.17	7.36
CRM/CHT	114.08	11.06
CRM/HDL	118.16	6.32
NCCLS中	119.04	5.69
NCCLS高	118.94	7.26
114	123.06	8.43
CRM2点	112.60	9.86
NCCLS2点	119.13	5.76
CRM-NCCL	116.00	5.36



標準品・ｺﾝﾄﾛｰﾙ・一次標準の番号は、各社の製品および候補品。

２．試薬Ｅ測定値をｘ軸とした際の、回帰式傾きの変動

標準	回帰式傾き mean	SD
各社	1.035	0.058
101	1.015	0.021
102	1.009	0.028
103	1.018	0.029
104	1.005	0.030
105	0.996	0.023
106	1.129	0.114
107	1.092	0.233
108	1.014	0.058
109	0.976	0.046
110	0.901	0.098
111	0.917	0.089
112	0.950	0.065
113	0.969	0.053
CRM/CHT	0.930	0.095
CRM/HDL	1.028	0.040
NCCLS中	1.018	0.038
NCCLS高	1.015	0.050
114	0.962	0.068
CRM2点	1.672	0.905
NCCLS2点	1.013	0.112
CRM-NCCL	1.202	0.302



標準品・ｺﾝﾄﾛｰﾙ・一次標準の番号は、各社の製品および候補品。

ＬＤＬ　標準：各社標準
第一試薬をｘ軸とする血清回帰式に対する相対残差

		測定試薬										残差		残差絶対値		測定平均値	
		試薬Ａ	試薬Ｂ	試薬Ｃ	試薬Ｄ	試薬Ｅ	試薬Ｆ	試薬Ｇ	試薬Ｈ	試薬Ｉ	試薬Ｊ	平均	ＳＤ	平均	ＳＤ	平均	ＳＤ
標準	101	-3.5%	-2.9%	4.7%	4.7%	0.0%	-0.8%	-2.9%	0.7%	-2.8%	4.4%	0.2%	3.4%	2.7%	1.7%	117.24	3.93
	102	-2.1%	-2.8%	6.8%	7.1%	0.0%	-0.5%	-3.7%	0.2%	-0.4%	2.3%	0.7%	3.7%	2.6%	2.6%	118.13	4.24
	103	-4.8%	-6.4%	4.2%	6.3%	0.0%	-1.2%	-0.5%	2.3%	-2.7%	1.3%	-0.1%	3.9%	3.0%	2.3%	124.35	4.96
	104	-1.2%	-4.1%	8.0%	7.0%	0.0%	-0.1%	-2.2%	8.7%	-3.2%	0.3%	1.3%	4.8%	3.5%	3.3%	128.74	5.77
	105	0.9%	-2.5%	6.7%	6.1%	0.0%	2.4%	-1.6%	4.4%	2.4%	3.9%	2.3%	3.1%	3.1%	2.2%	116.48	3.28
	106	-22.4%	-22.8%	-11.0%	-8.7%	0.0%	-0.2%	-0.8%	-16.5%	-8.7%	-5.3%	-9.7%	8.6%	9.7%	8.6%	128.50	12.74
	107	-8.6%	-2.4%	12.4%	16.1%	0.0%	-2.1%	-3.0%	-0.9%	-19.5%	-44.6%	-5.3%	17.0%	11.0%	13.6%	120.00	24.97
	108	-4.1%	-8.0%	9.0%	7.7%	0.0%	-0.9%	-2.6%	-4.8%	-2.9%	15.5%	0.9%	7.4%	5.6%	4.6%	124.62	8.22
	109	-0.5%	-0.1%	10.0%	9.4%	0.0%	0.1%	-3.1%	4.6%	9.3%	14.0%	4.4%	5.9%	5.1%	5.2%	126.21	6.83
	110	23.8%	22.6%	10.3%	11.0%	0.0%	0.9%	-1.7%	10.7%	32.6%	29.6%	14.0%	12.5%	14.3%	12.1%	146.41	15.69
	111	21.5%	18.1%	7.0%	9.4%	0.0%	0.5%	0.6%	9.5%	30.1%	24.9%	12.2%	10.9%	12.2%	10.9%	139.60	13.10
ｺﾝﾄﾛｰﾙ	112	9.8%	7.6%	10.5%	12.3%	0.0%	-0.9%	-5.3%	9.5%	15.9%	22.2%	8.2%	8.3%	9.4%	6.6%	122.16	8.85
	113	-0.8%	0.0%	10.3%	14.0%	0.0%	-1.2%	-1.0%	1.4%	7.4%	17.0%	4.7%	6.9%	5.3%	6.4%	113.17	7.36
一次標準ｌ-20/CHT		20.2%	17.7%	3.2%	4.4%	0.0%	0.0%	-0.1%	9.1%	26.6%	28.3%	10.9%	11.3%	11.0%	11.3%	114.08	11.06
JCCRM223-20/HDL		-7.2%	-8.6%	4.6%	4.9%	0.0%	-0.8%	-5.5%	4.6%	-4.6%	0.3%	-1.2%	5.0%	4.1%	2.9%	118.16	6.32
	NCCLS中	-5.6%	-7.1%	6.5%	5.2%	0.0%	-0.3%	-5.4%	4.9%	-0.4%	1.5%	-0.1%	4.8%	3.7%	2.8%	119.04	5.69
	NCCLS高	-8.2%	-8.5%	7.6%	8.3%	0.0%	0.0%	-1.6%	-1.1%	-1.9%	4.7%	-0.1%	5.7%	4.2%	3.6%	118.94	7.26
	114	12.7%	13.8%	0.5%	0.8%	0.0%	-0.5%	-2.5%	15.7%	9.8%	16.5%	6.7%	7.7%	7.3%	7.0%	123.06	8.43

標準品・ｺﾝﾄﾛｰﾙ・一次標準の番号は、各社の製品および候補品。

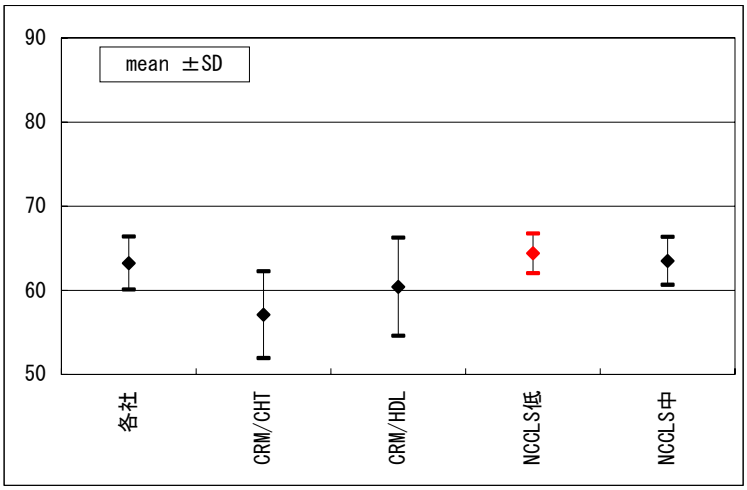
ＨＤＬドライ
キャリブレーションに用いる標準を変更した場合の、血清実測値（n=56）の変動

１．測定値平均の変動

(mg/dL)

標準	mean	SD
各社	63.23	3.15
CRM/CHT	57.11	5.16
CRM/HDL	60.42	5.83
NCCLS低	64.40	2.35
NCCLS中	63.50	2.84

ドライ試薬：３社

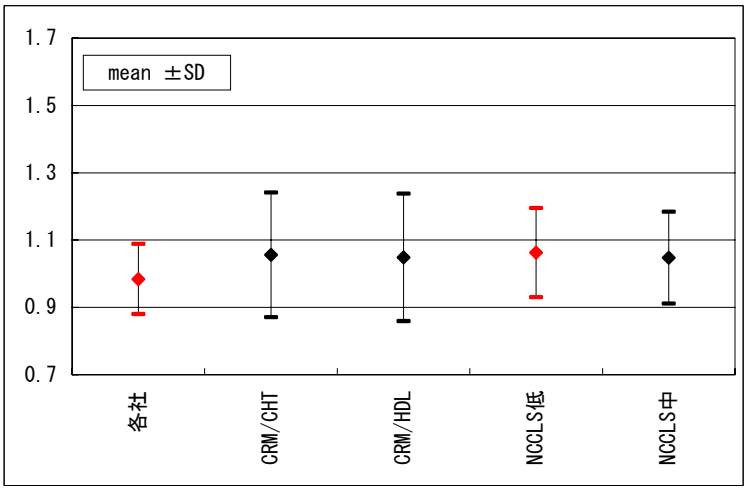


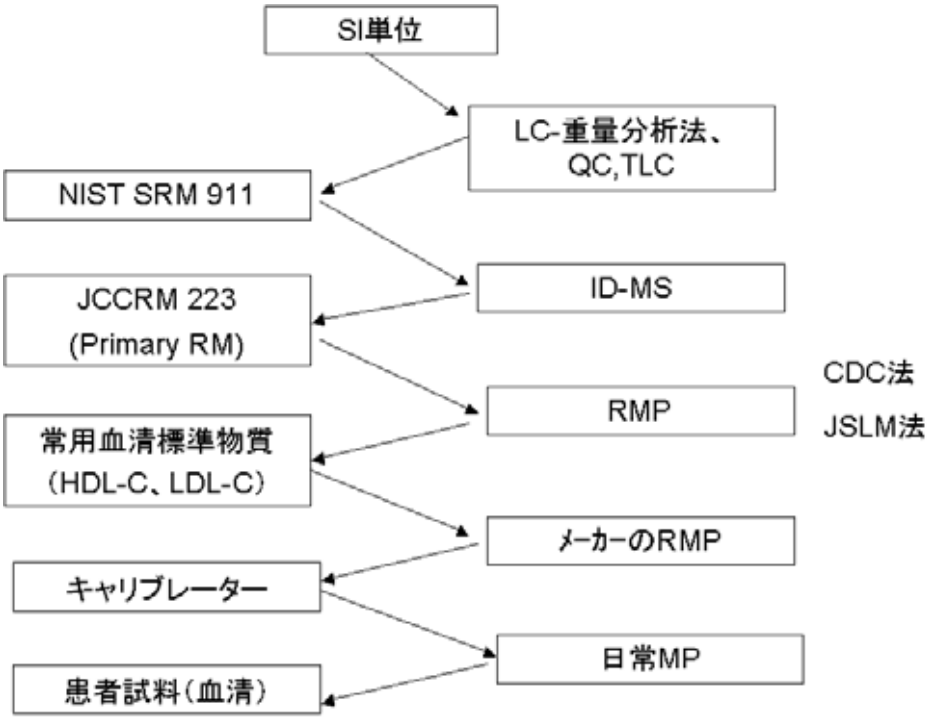
２．試薬Ｆ測定値をｘ軸とした際の、回帰式傾きの変動

回帰式傾き

標準	mean	SD
各社	0.984	0.104
CRM/CHT	1.056	0.185
CRM/HDL	1.048	0.190
NCCLS低	1.063	0.132
NCCLS中	1.048	0.136

ドライ試薬：３社





血清HDL-CおよびLDL-C測定のためのトレーサビリティ体系図

２－２－３－１１　アルブミン

要　旨

１）ヒト血清アルブミンから高純度に分離精製した単量体アルブミンを原料にして試作された３種類の臨床検査用アルブミン標準物質（実用標準物質、血清用常用標準物質、尿用常用標準物質）を用いて、市販測定キットの測定特性を検討した。

２）実用標準物質については、その下位に位置する血清用常用標準物質および尿用常用標準物質へ、尿用常用標準物質から試薬校正物質（市販キット添付校正物質）への値のトランスファーラビリティを確認することができた。

３）血清用常用標準物質から試薬校正物質へのトランスファーラビリティは、改良 BCP 法では確保できることが示されたが、他の測定法では測定試薬の特性上の問題で十分に確保することが難しい。

１．はじめに

血清アルブミンは血清総タンパク質の 50～70％を占め、血漿膠質浸透圧の維持、各種物質の運搬に重要な役割を果たしている。臨床的には肝における合成、胃、腸管、腎、肝、網内系などによる異化・漏出、血管内外における分布の異常などの因子によって変動する。一般に総タンパク質とともに、体内タンパク質代謝異常の指標として測定される。また、栄養状態の重要な指標としても測定されている。

一方、尿アルブミン（尿ミクロアルブミン）は糖尿病性腎症など、腎臓の糸球体の疾患指標として重視され、腎透析の判断指標としても重要である。

２．目的

アルブミンの測定はアルブミンと色素との結合による色調の変化を利用してアルブミン濃度を測定する色素法や抗原抗体反応を利用した免疫法がある。色素としては HABCA, BCG, BCP などが用いられるが、HABCA はビリルビンや薬剤の影響を受け、BCG 法はグロブリンと反応するため、グロブリンの濃度の影響を受ける。

一方、BCP 法はグロブリンの影響は受けないが、酸化型および還元型アルブミンとは色調に差がある。そのため、各種測定法間の互換性を確保するためには、それぞれの測定値を補正するための標準物質が必須である。その標準物質を確定し、測定値のトレサービリティを確保するための測定体系を確立することを目的とする。なお、アルブミンの測定体系を図１に示す。

３．共同研究先

（１）実用標準物質および血清用常用標準物質：日本臨床化学会　酵素・試薬専門委員会アルブミン標準物質開発プロジェクト（委員長：大澤　進　九州大学）

（２）尿用常用標準物質：日本臨床化学会血漿蛋白専門委員会尿アルブミン標準物質開発プロジェクト（委員長：伊藤喜久　旭川医大）

（３）基準測定法の開発：産業技術総合研究所計測標準研究部門（高津章子）

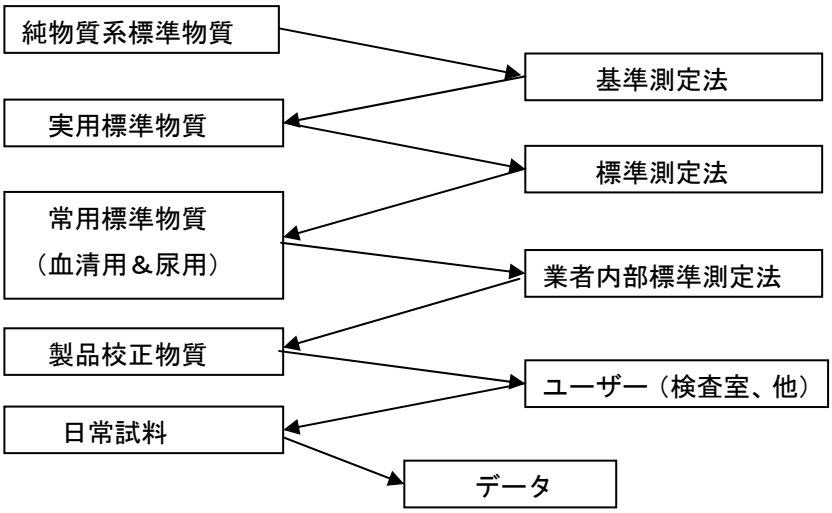


図１．アルブミンの測定体系

４．標準物質設定の経緯

（１）測定値の互換性の現状

現在、世界的にアルブミンの標準物質として、実用標準物質に相当するものとして、米国 NIST SRM927 があるが、これはウシ血清アルブミンの高純度標品であり、ヒトアルブミン測定の標準物質としては問題がある。また、常用標準物質としては IFCC の CRM470 があるが、本品はヒト血清ベースであり、アルブミン以外の多くのタンパク質を含有しており、常用標準物質としては使用可能であるが実用標準物質としては問題がある。それ故、現時点においてはヒトアルブミンの実用標準物質は NIST SRM927 以外は存在しない。CRM470 を標準物質として、便宜上使用しているのが現状である。

一方、測定法は、血清においては BCG 法、BCP 法など多くの方法があるが、それぞれの方法において反応特異性がことなり、グロブリンなどのタンパク質の影響を受ける方法が主流であり、測定法間の互換性はない。そのため、どんな方法に対しても互換性のある高純度ヒトアルブミン標準物質を作製した。なお、平成 17 年度日本臨床技師会臨床検査精度管理調査報告書（2,436 施設参加）のアルブミン測定の結果を図２に示した。その結果、BCG 法は BCP 法より高値を示し、収束性もまだ十分でないことが伺われる。

（２）標準化および標準物質の設定経過

現在、臨床検査分野において、アルブミン測定の基準測定法および実用標準物質は存在しない。ただ、IFCC が決めた常用標準物質 CRM470 が便宜上使用されており、それなりの効果を上げている。しかし、本標準物質もすべての測定法にコミュータブルでなく、問題を抱えている。そこで、ヒト血清アルブミンから分離精製した高純度のヒトアルブミン単量体のみを用いた実用標準物質、血清用常用標準物質、尿用常用標準物質のプロトタイプが作製された。それらの性状と規格を図３および表 1～3 に示す。

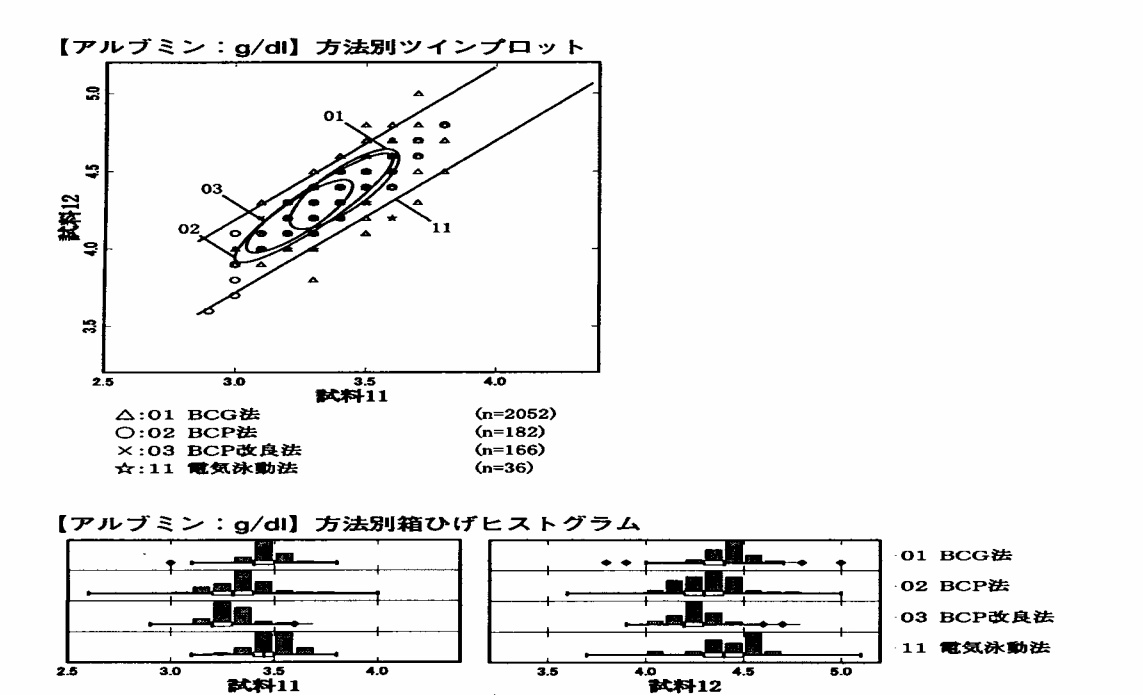


図２．アルブミン測定の双値図とヒストグラム（平成 17 年度日本臨床技師会臨床検査精度管理調査報告書

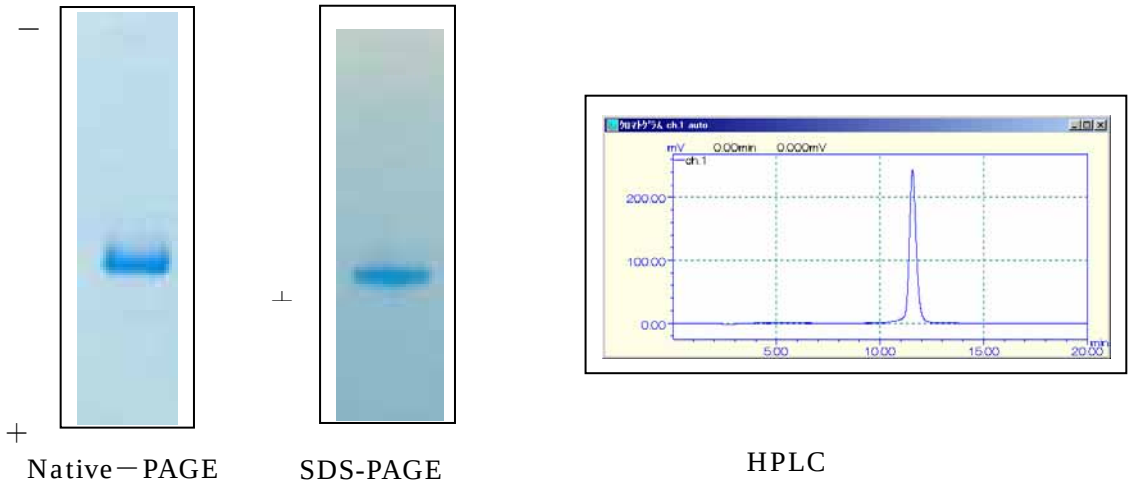


図３．精製ヒトアルブミン単量体の電気泳動像および HPLC クロマトグラム

表１　ヒトアルブミン実用標準物質の規格

項　　目	規　　格	確　認　結　果
１　適用範囲	本品はヒトの尿中および血清中アルブミンを測定する場合の実用標準物質として使用することを目的とする。	
２　原料		
2-1 起源	ヒト血清を起源とする。	ヒト血清／適合
2-2 基材	ヒト血清アルブミン	ヒト血清アルブミン／適合
2-3 添加剤	緩衝材および安定化剤を添加する。	規格に従う／適合
2-4 感染物質	本品は、原料であるヒト血液の HBs 抗原、HCV 抗体、HIV-1 抗体および 2 抗体の検査を行い、陰性の結果を得ていること。 注意）感染性物質の検査で陰性の結果を得ていても、感染の可能性を完全に否定できるものではない。また、それ以外の感染性物質の検査は実施していないので、感染の危険性があるものとして、検体と同様に十分に注意して取り扱う。	HB s 抗原、HCV 抗体、HIV-1 抗体及び２抗体の検査の結果、陰性／適合
３　特性		
3-1 形状	凍結乾燥品	白色固形の凍結乾燥品／適合
3-2 包装	ガラスバイアル、1ml（使用時）の単品	規格に従う／適合
3-3 反応性	ヒト血清と同様な挙動を示す。	反応性試験実施中
3-4 物理学的性質		
3-4-1 分子量	SDS-PAGE で 67KDa である。	SDS-PAGE で 67KDa／適合
3-4-2 純度	HPLC 分析で 98%以上。	100%の純度／適合
3-5 安定性		
3-5-1 開封前の安定性	1）有効期間：5 年（10℃以下冷蔵）を目標とするが、最終的には安定性試験終了後に決定する。 2）有効期間内でのモノマーアルブミン残存量は 98%以上である。	保存安定性試験実施中 保存安定性試験実施中
3-5-2 開封後の安定性	10℃以下の保管で 8 時間使用できる	10℃以下および 25℃保存で少なくとも溶解後 25 時間は使用可能であった。／適合
3-6 均一性	1）10 バイアルの 3 回反復測定を行いバイアル間差は±3%以内とする。 2）不確かさを表記する	バイアル間差は CV = 0.77%（n=10 vial）／適合 （株）カイノスキット測定結果、±0.05 g/dL／適合
４　アルブミン濃度	使用時に 3.0±0.5g/dL とする。	（株）カイノスキット測定結果：ALB は 3.35mg/dL／適合

表２　血清アルブミン常用標準物質の規格

項　　目	規　　格	確　認　値
１　適用範囲	本品はヒトの尿中および血清中アルブミンを測定する場合の実用標準物質として使用することを目的とする。	
２　原料		
2-1 起源	ヒト血清を起源とする。	ヒト血清／適合
2-2 基材	ヒト血清アルブミン	ヒト血清アルブミン／適合
2-3 添加剤	緩衝材および安定化剤を添加する。	規格に従う／適合
2-4 感染物質	本品は、原料であるヒト血液の HBs 抗原、HCV 抗体、HIV-1 抗体および 2 抗体の検査を行い、陰性の結果を得ていること。 注意)感染性物質の検査で陰性の結果を得ていても、感染の可能性を完全に否定できるものではありません。また、それ以外の感染性物質の検査は実施していませんので、感染の危険性があるものとして、検体と同様に十分に注意して取り扱う。	HB s 抗原、HCV 抗体、HIV-1 抗体及び２抗体の検査の結果、陰性／適合
３　特性		
3-1 形状	凍結乾燥品	白色固形の凍結乾燥品／適合
3-2 包装	ガラスバイアル、1ml(使用時)の単品	規格に従う／適合
3-3 反応性	ヒト血清と同様な挙動を示す。	反応性試験実施中
3-4 物理学的性質		
3-4-1 分子量	SDS-PAGE で 67KDa である。	SDS-PAGE で 67KDa／適合
3-4-2 純度	HPLC 分析で 95%以上。	100%の純度／適合
3-5 安定性		
3-5-1 開封前の安定性	1) 有効期間:5 年(10℃以下冷蔵)を目標とするが、最終的には安定性試験終了後に決定する。 2) 有効期間内でのモノマーアルブミン残存量は 95%以上である。	保存安定性試験実施中 保存安定性試験実施中
3-5-2 開封後の安定性	10℃以下の保管で 8 時間使用できる	10℃以下および 25℃保存で少なくとも溶解後 25 時間は使用可能であった。／適合
3-6 均一性	1) 10 バイアルの 3 回反復測定を行いバイアル間差は±3%以内とする。 2) 不確かさを表記する	バイアル間差は CV = 0.77%（n=10 vial）／適合 （株）カイノスキット測定結果、±0.05 g/dL／適合
４　アルブミン濃度	使用時に 3.0±0.5g/dL とする。	（株）カイノスキット測定結果、ALB は 3.35mg/dL／適合

表３　尿アルブミン常用標準物質の規格

項目	規格	確認値
１　適用範囲	本品はヒトの尿中および血清中アルブミンを測定する場合の実用標準物質として使用することを目的とする。	
２　原料		
2-1 起源	ヒト血清を起源とする。	ト血清／適合
2-2 基材	ヒト血清アルブミン	ヒト血清アルブミン／適合
2-3 添加剤	緩衝材および安定化剤を添加する。	規格に従う／適合
2-4 感染物質	本品は、原料であるヒト血液の HBs 抗原、HCV 抗体、HIV-1 抗体および２抗体の検査を行い、陰性の結果を得ていること。注意）感染性物質の検査で陰性の結果を得ていても、感染の可能性を完全に否定できるものではありません。また、それ以外の感染性物質の検査は実施していませんので、感染の危険性があるものとして、検体と同様に十分に注意して取り扱う。	HB s 抗原、HCV 抗体、HIV-1 抗体及び２抗体の検査の結果、陰性／適合
３　特性		
3-1 形状	凍結乾燥品	白色固形の凍結乾燥品／適合
3-2 包装	ガラスバイアル、1ml（使用時）の単品	規格に従う／適合
3-3 反応性	ヒト血清と同様な挙動を示す。	反応性試験実施中
3-4 物理学的性質		
3-4-1 分子量	SDS-PAGE で 67KDa である。	SDS-PAGE で 67KDa ／適合
3-5 安定性		
3-5-1 開封前の安定性	1)　有効期間:5 年（10℃以下冷蔵）を目標とするが、最終的には安定性試験終了後に決定する。 2)　有効期間内でのモノマーアルブミン残存量は 95%以上である。	保存安定性試験実施中 保存安定性試験実施中
3-5-2 開封後の安定性	10℃以下の保管で 8 時間使用できる	10℃以下および 25℃保存で少なくとも溶解後 25 時間は使用可能／適合
3-6 均一性	1)10 バイアルの 3 回反復測定を行いバイアル間差は±3%以内とする。 1)　不確かさを表記する	バイアル間差は CV = 0.77%（n=10 vial）／適合 シスメックス社キット測定結果、±2.73mg/dL／適合
４　アルブミン濃度	使用時に 300±50mg/dL とする。	シスメックス社キット測定結果、ALB は 293.7mg/dL／適合

５．実試料標準物質の作製プロトコル

図１に示したように、臨床検査におけるアルブミンの測定体系では、測定のトランスファーラビリティは、純物質系標準物質から基準測定法で値付けられた実用標準物質から実質的に始まることになり、高位の高純度物質である実用標準物質→常用標準物質→検量用校正物質（日常検査キット添付キャリブレータ）間においてそれぞれの分析方法によって上位から下位への伝達性（transferability）と下位から上位への遡及性（traceability）が確保されることになる。

本研究では、ヒトアルブミンの高純度物質(アルブミン単量体として 98%以上)を原料として、これらに緩衝液、安定化剤等を添加した後、凍結乾燥してヒトアルブミンの実用標準物質、血清用および尿用常用標準物質とした。さらに、これらのプロトタイプの性状に関しては表１の規格をもとに特性を確認した。なお、血清アルブミンと尿アルブミンの濃度が 100 倍以上異なり、また、測定原理も異なることから、両者に共通な常用標準物質の作成が困難なために、アルブミンの測定体系では常用標準物質に血清用と尿用の 2 種類の標準を設定することが必要となる。

ヒトアルブミンの基準測定法は決定されていないので、液体クロマトグラフィー法およびアミノ酸分析法の２種類を検討している。なお、今回、共同実験を実施するに当たり、CRM470 を標準物質として、実用標準物質および血清常用標準物質は改良 BCP 法を、尿常用標準物質はネフェロメトリー法（DADE Behring 社試薬）用いて暫定的に値付けを行い、暫定値として改良 BCP 法による測定の平均値；3.34g/dl を採用した。

６．アルブミン測定基準品の評価

（１）評価研究の目的

ヒト血清アルブミンから精製、試作した標準物質が日常検査法に於ける血清アルブミンの実用標準物質および常用標準物質になり得るかを確認するために正確さの伝達性を評価した。

（２）評価方法

患者プール血清３濃度（正常下限、正常、正常上限）とアルブミン実用基準物質および常用基準物質を各種日常検査法で測定し、アルブミン実用基準物質の暫定評定値で日常検査試薬での測定値を補正した前後の患者プール血清３濃度の測定値のバラツキがどの程度収束するかを調べることで、その伝達性を確認した。

（３）試料および試薬

試料

１）アルブミン実用基準物質（凍結乾燥品：1ml 溶解）

２）アルブミン常用基準物質（凍結乾燥品：1ml 溶解）

３）CRM470（ロット No. 200501　使用期限：2006 年 3 月反応性確認用）

４）患者プール血清３種類（低、中、高濃度）

測定試薬

市販測定キット 17 種類（BCP 法５種、BCG 法９種、ラテックス凝集法　１種、BCG ドライケミストリー法）であった。これらはそれぞれのキットには独自の校正用標準物質が添付されている。

表 4　使用した測定試薬

測定法	試薬名	測定機器	企業名
暫定対照法	アクアオートカイノス　ALB 試薬(新 BCP 法：村本法)	日立 7170	カイノス
BCP 法	オートワコー　アルブミン	日立 7170	和光純薬
	アキュラスオート ALB	日立 7180	シノテスト
	ＥＡテスト‘栄研’ＡＬＢ	日立 7180	栄研化学
	「セロテック」ＢＣＰ－Ｌ	日立 7170	セロテック
ラテックス法	LX 試薬‘栄研’Alb-Ⅱ	LX-2200	栄研化学
BCG 法	アルブミン Ⅱ-HA テストワコー	日立 7170	和光純薬
	ＥＪテスト‘栄研’ＡＬＢ	日立 7180	栄研化学
	エクディアＸＬ‘栄研’ＡＬＢ-ＢＣＧ	日立 7180	栄研化学
	シカリキッド ALB	日立 7170S	関東化学
	イアトロファインＡＬＢⅡ	ﾓｼﾞｭﾗｰｱﾅﾘﾃｨｸｽP	三菱化学ヤトロン
	自動分析用試薬「生研」ALB-G	TBA-120FR	デンカ生研
	自動分析用試薬｢RD｣アルブミン	ﾓｼﾞｭﾗｰｱﾅﾘﾃｨｸｽP	ロッシュ
	ﾘｷﾃｯｸ ｱﾙﾌﾞﾐﾝ ﾌﾟﾗｽ	ﾓｼﾞｭﾗｰｱﾅﾘﾃｨｸｽP	ロッシュ
	ｺﾊﾞｽ試薬 ALBⅡ	COBAS INTEGRA 700	ロッシュ
ドライケミストリー法（BCG）	富士ドライケムスライドＡＬＢ－Ｐ	富士ドライケム５５００	富士フィルム
	スポットケムⅡアルブミン	SP-4410	アークレイ

（4）結果

暫定対照法（新 BCP 法）を含む 17 種類の日常検査試薬（BCP 法 5 種、BCG 法 9 種類、ドライケミストリー；BCG 法 2 種類、ラテックス免疫比濁法 1 種類）について、患者プール血清 3 種類の実用標準物質および CRM 470（国際蛋白標準物質）による補正効果を調べた結果を表５に示した。標準物質による患者プール血清値の補正効果は、補正前後でほぼ同等であったのは CRM470 であった。これは各試薬の検量物質が CRM470 を基準物質として採用していると推察された。実用標準物質による補正は、補正後が３濃度プール血清ともに変動係数（%）が 2-4 倍大きな数値となり方法間の測定値のばらつきが拡大し、補正効果は見られなかった。

ドライケミストリーは試料の組成（粘性）により影響が指摘されており、これを除外して補正効果を見ると、CV 7.1-11.7%と改善がみられるが、補正前よりは方法間のばらつきが大きい。
また、図 4 には CRM470 補正値と実用標準物質補正値の相関を示したが、市販の測定試薬を用いた場合、実用標準物質補正値の方が低値を示し、両者の間にはＹ切片があり、両方間にはコミュータビリテイが取れないことがわかる。

表５　実用標準物質およびCRM470（国際蛋白標準物質）による補正効果

	補正前		実用標準物質補正				CRM470 補正	
測定試料名	全体	ドライ除外	全体	ドライ除外	BCP 法	BCG 法	全体	ドライ除外
実用標準物質	10.8	6.1	0.1	0.1	0.0	0.0	10.8	6.4
常用標準物質	10.6	6.1	1.4	2.6	1.8	3.1	10.5	6.4
CRM 470	1.8	1.8	8.4	6.6	6.8	5.5	0.4	0.2
患者血清-低濃度	6.5	6.8	12.9	11.7	3.9	7.5	6.7	7.0
患者血清-中濃度	3.2	3.3	10.4	8.7	5.3	6.1	3.3	3.5
患者血清-高濃度	2.2	2.2	9.2	7.1	5.9	6.2	2.1	1.8

血清アルブミンの日常検査試薬は２種類の測定試薬の異なる測定法が利用されているため、測定値の標準化の障害として下記のような問題点がある。

１）CRM470 を用い、各社独自（ヒト血清に近似）のキャリブレーターを設定しているため、キット添付のキャリブレーター使用時のデータはばらつきが少ない（CRM470 は血清ベースのため、グロブリンを含む）。

２）BCG 法はグロブリンとも反応するため、BCP 法と比較して高値を示す。

３）BCP法はグロブリンとは反応しないが、酸化型アルブミンと還元型アルブミンとでは反応性が異なる。暫定対照法である新BCP法はすべて酸化型に変換しているため、血清が新鮮でも古くても差は生じないが、酸化剤を含まない従来のBCP法は新鮮血で低値を示す。

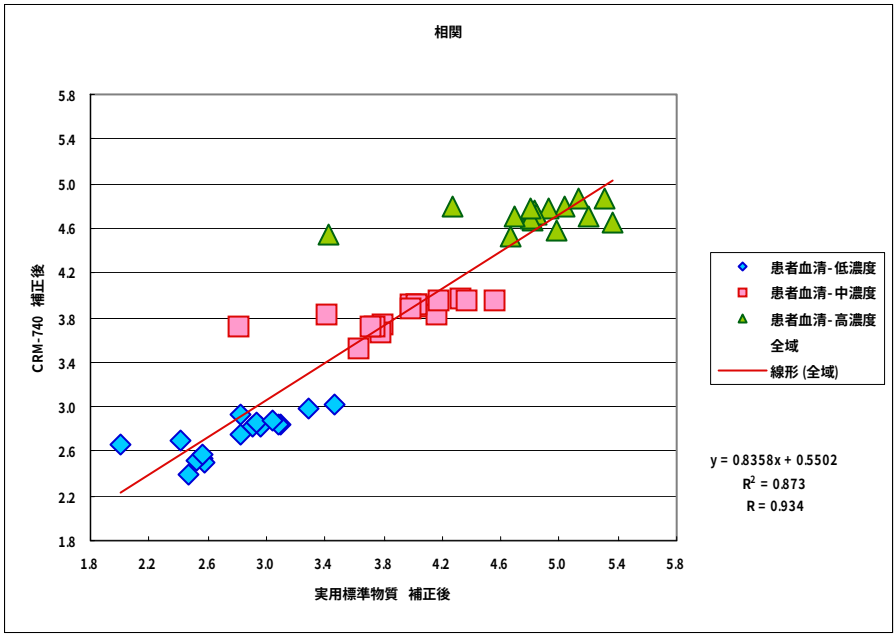


図４．CRM470および実用標準物質による補正後の測定値の相関

２種類の患者プール血清を各社測定試薬で測定した結果を図５に示した。使用した各社試薬はCRM470を基準物質として校正標準物質を調製しているため、BCG法，BCP法ともに、校正標準物質補正とCRM470補正との間に大きな改善はなかった。

一方、実用標準物質による補正値は補正前より分散が拡大した。特にBCG法においてその傾向が顕著であり、BCG法がアルブミン以外のタンパク質と反応する反応特異性の欠点を反映したものである。BCP法においては補正効果が確認出来た。

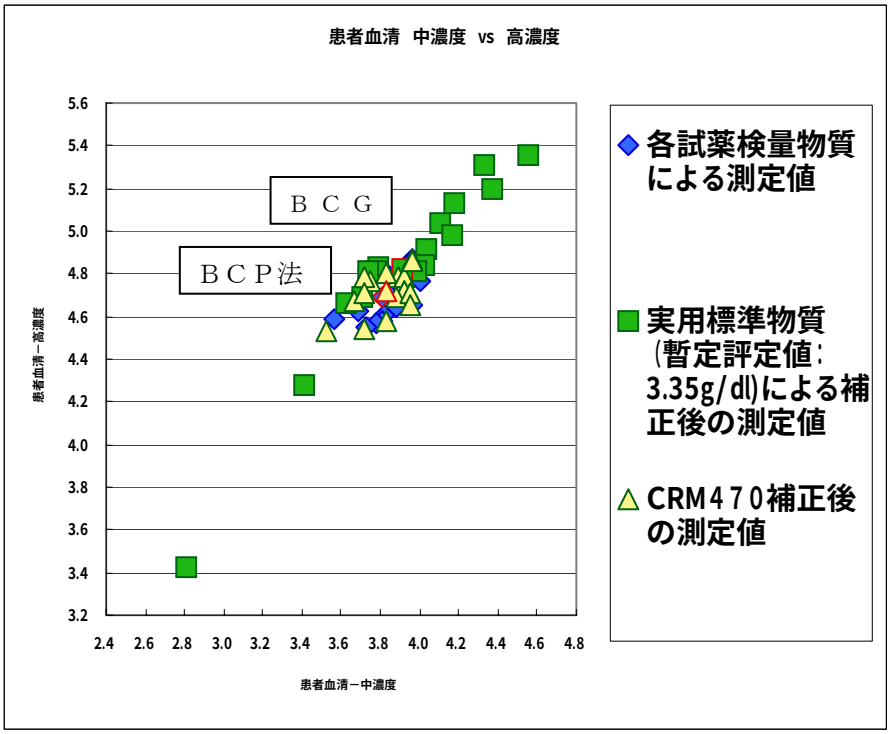


図５．補正物質による測定値の収束性

日常検査法で利用されている色素法では、利用する色素により血清蛋白に対する反応性が異なることが知られており、どの方法にも正確さを伝達させ、かつ反応互換性を持たせることは難しい。とくに日常的に使用されている血清アルブミン測定試薬はアルブミンに対する反応特異性に乏しく、便宜上、見かけ上の値を求めているにすぎないため、校正用標準物質は各社で異なり、共用出来ないのが現状である。

また、BCG法とBCP法とではコミュータビリティが取れていない。結果的に、今回設定した実用標準物質および常用標準物質を日常法に使用出来るのは新BCP法のみであった。このことは実用基準物質を設定するためには測定法をアルブミンに特異性高い方法に改善することが不可欠であることを示している。

今回の実験から、アルブミンに特異性が高い測定法（新BCP法）が普及すれば、実用標準物質は十分利用可能であることが確認できた。しかしながら、反応特異性が異なる検査法が複数利用されている現状では、実用標準物質を各種メーカー測定法の校正用標準物質への値付けのための標

準物質としての機能は十分に備えているが、日常検査室で正確さの確認のために直接用いることはできない。

今回開発した実用標準物質および常用標準物質は由来がヒトアルブミンであり、他の血清タンパク質を含有せず、純度や物理化学的特性に優れた標準物質であり、実用標準物質および常用標準物質としての特性を備えている。ここで重要なのは常用標準物質から試薬校正標準物質への値を伝達するための測定法の開発が標準化への鍵となる。

７．今後の課題

実用標準物質の値付けのための基準測定法、実用標準物質から常用標準物質へ、さらに、常用標準物質から試薬校正物質への値の伝達のための基準測定法を設定しなければならない。基準測定法および実用標準物質から常用標準物質への値付け法はアミノ酸分析法を検討中である。一方、常用標準物質から試薬校正物質への値の伝達のための基準測定法の開発も実施しなければアルブミン測定体系が完成しない。

８．結び

ヒト血清中のアルブミンは単量体のほかに、二量体が存在し、また、脂質、Ca，ビリルビン、薬剤などを結合しており、決して均一な物質でない。これらを蛋白質分子として正確に測定するには、分子として安定な物質が標準物質と正確な測定法が必須である。これらを早期に確立することが標準化には欠くことの出来ない要素である。

２―２－３－１２　膵型アミラーゼ

要　旨

１）市販膵アミラーゼ（P-AMY）測定キットの評価を実施した。その結果、相関係数は良好であったが、基質により測定値に差が見られた。

２）本研究では実用標準物質および常用基準測定法を開発する。

３）標準物質はヒト膵型アミラーゼを原料とする。

４）常用基準測定法は唾液アミラーゼ（S-AMY とする）活性阻害抗体（抗 S-AMY 抗体）を用いて S-AMY 活性をブロックした後、JSCC アミラーゼ測定勧告法で P-AMY 活性を測定することとした。

５）総 AMY 活性測定の標準物質は、JCCLS の常用酵素標準物質（JCCLS CRM001）とする。

１．はじめに

アミラーゼ活性測定の臨床的目的は主に膵疾患診断であり、日本では年間約 5,500 万件も測定されており、欧米でも重要な検査項目である。2006 年３月に IFCC から総アミラーゼ活性測定の勧告法の最終案が公表された。国内においても IFCC 勧告法を検証し、JSCC 常用基準測定法を確立した。

一方、膵疾患に対する診断特異性は、総アミラーゼ活性よりも膵型アミラーゼ活性のみを測定する方が高いとされている。現在日常検査に用いられている膵型アミラーゼ測定法は、抗ヒト S-AMY 抗体を用いた S-AMY 阻害法が主流である。P-AMY 活性測定法に用いられてるアミラーゼの基質はさまざまで、P-AMY 活性測定値は、基質の違いにより、その活性値は最大約２倍の差があるのが現状である。

そこで、本研究では、膵型アミラーゼ活性測定値における測定方法間の差を縮小し、データの互換性を維持するために実用標準物質および常用基準測定法を設定することを目的とする。

２．P-AMY の測定体系

P-AMY の測定体系を図１に示した。基準測定法は JSCC アミラーゼ活性測定基準法とし、その方法で値付けされた実用標準物質（P-AMY 単品）を設定する。さらに、S-AMY 活性阻害抗体を用いた常用基準測定法を新たに開発して、実用標準物質の値を JCCLS の常用酵素標準物質(JCCLS CRM001)に、さらに、試薬校正物質、患者試料測定へと伝達する。図１のうち、JSCC アミラーゼ測定勧告法および常用酵素標準物質（JCCLS CRM001）は既に設定されているため、今回の作業では実用標準物質および常用標準測定法を開発する。

３．常用基準法設定の基本方針

膵型アミラーゼ活性測定の常用基準法設定の基本方針は、抗ヒト S 抗体を用いた S 型アミラーゼ阻害法とし、アミラーゼ活性測定は、IFCC 勧告法に準じた方法（JSCC アミラーゼプロジェクトで提示した方法）で行うことで合意した。

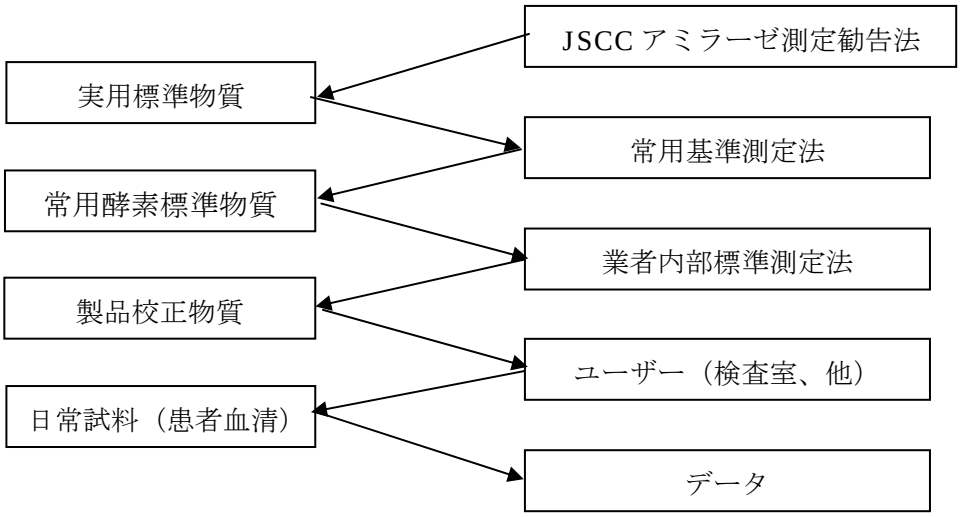


図１　膵アミラーゼ測定体系

４．実施計画

膵型アミラーゼ活性測定の常用基準法設定の実施計画を以下に示した。

（１）抗ヒトＳ抗体について市販可能な製品を調査する。

（２）抗ヒトＳ抗体によるＳ型アミラーゼ阻害試験の手順を作成する。

（３）抗ヒトＳ抗体のアミラーゼ試薬への添加条件を設定する。

（４）常用基準法における測定値普遍性の確認試験。

（５）膵型アミラーゼ活性測定の自動化法作成および酵素標準物質（ERM）および検量用 ERM の酵素反応性試験の実施。

５．共同研究体制

実用標準物質および常用基準測定法の開発：日本臨床化学会　酵素・試薬専門委員会膵型アミラーゼ活性常用基準測定法開発プロジェクト（委員長：白井秀明　関東労災病院検査科）

代　表　白井秀明（関東労災病院検査科）

副代表　桑　克彦（筑波大学臨床医学系）

関口光夫（日本大学板橋病院検査部）

委　員　大澤　進（九州大学医学部保健学科）

細萱茂美（山梨大学医学部附属病院）

飯塚儀明（筑波大学附属病院検査部）

芳賀利一（三井記念病院中央検査部）

野村　博（ﾛｼｭ・ﾀﾞｲｱｸﾞﾉｽﾃｯｸｽ㈱）

吉海　毅（日本臨床検査薬協会）

谷　　渉（(中法 HECTEF　SR ｾﾝﾀｰ）

加藤隆則（日製・日立健康管理ｾﾝﾀ）

斉藤友幸（筑西市民病院臨床検査科）

大貫経一（茨城東病院研究検査科）
鈴木英明（第一化学薬品㈱）
花田寿朗（和光純薬工業株）
足立　浩（ｱﾙﾌﾚｯｻﾌｧｰﾏ㈱）
新井信夫（ｼｽﾒｯｸｽ㈱）
顧問　渡辺伸一郎（東京女子医科大学）

６．標準化および標準物質の設定経過

認定されたP-AMY標準物質およびP-AMY活性測定の基準法は設定されていない。臨床現場では、抗S-AMY抗体を用いてS-AMY活性を阻害した後、P-AMY活性を測定するS-AMY活性阻害法が多く用いられているが、P-AMY活性測定に用いる基質により、活性が異なる。そのため、P-AMY活性測定の体系化と標準化が望まれる。

以上のことから、本プロジェクトでは次の作業を開始した。

（１）P-AMY活性測定の現状調査。

（２）P-AMY活性測定標準化の基本方針の設定

（３）P-AMY活性測定の常用基準法設定のためのプロトコルの作成

７．調査結果

臨床現場で用いられているP-AMY活性測定法の原理は抗ヒトS-AMY抗体によるS-AMY活性阻害の後、残存したP-AMY活性を測定するS-AMY阻害法である。残存したP-AMY活性測定は血清総AMY測定キットが使用されており、そのキットに用いられているAMY基質により測定値に差があり、最大約2倍の差が観察された。

なお、AMY基質EtG2-PNPを基準基質（Ｘ）とし、各種基質（Ｙ）との相関を相関式で示す。各基質とも相関係数ｒは0.998以上であったが、G5以上の基質は傾きおよび切片とも基準基質によく一致していた。

しかし、GalG4-CNP以外のG4以下の基質は傾きが小さく、切片が大きい傾向にあった。GalG4-CNPは傾きが1.8倍もあり、他の基質と大きく異なった。

＜相関式＞

Ｘ：EtG7-PNP、Ｙ：各基質

基質(Y)				
GalG5-PNP	ｒ＝0.999、	Y=1.028X	－	0.01
BG5-PNP	r=0.999	Y=1.058X	＋	2.71
GalG5-CNP	r=0.999	Y=0.950X	＋	2.77
GalG4-CNP	r=0.998	Y=1.833X	+	3.81
GalG2-CNP	r=0.998	Y=0.851X	+	5.93

＜抗ヒトS-AMY抗体＞

S-AMY阻害法に用いられる抗ヒトS-AMY抗体を調査の結果、入手可能な抗ヒトS-AMY抗体は、

ロッシュ社製の Tu88E8 IgG と Tu66C7 IgG の２種、およびアルフレッサファーマ社製の MNHAMY-2 と MNGAMY-3 の２種類、計 4 種類であった。なお、市販キットでは両社とも２種の抗ヒト S-AMY 抗体を混合して用いる。

＜阻害試験用試料＞

PP-AMY 測定の特異性を検証するための S-および P-AMY 候補品を検討した結果、S-, P-AMY 候補品は、それぞれ３種類であり、Ｓ型の標品は全て人唾液由来であり、P 型標品はヒトおよびブタ膵由来であった。

候補品

P-AMY：　・CRM470（ヒト膵液由来、IRMM）
- キャリブザイム AMP-P（ヒト膵液由来、シスメックス株）
- α－AMY（ブタ膵由来、ロッシュ株）

S-AMY：　・α－AMY（ヒト唾液由来、Sigma）
- キャリブザイム AMP-S（ヒト唾液由来、シスメックス株）
- AMY-S Purified human（ヒト唾液由来、国際バイオ）

８．P-AMY 活性測定の常用基準法作成の基本方針

・P-AMY 常用基準法は P/S の分離に抗 S-AMY 抗体を用いた S-AMY 免疫阻害法を基本技術とする。

・P-AMY の酵素活性測定は JSCC 常用基準法（基質：EtG7-PNP）を用いる。

９．今後の活動予定

今後の活動は、以下の内容検討をする。

（１）抗ヒトＳ抗体阻害試験に用いるＳ，Ｐ型標品を候補品の中から選択する。

（２）抗ヒトＳ抗体の組み合わせおよび添加条件の検討を行い、P-AMY 特異性を確保する。

（３）抗ヒトＳ抗体阻害試験法を作成し、各抗ヒトＳ抗体の阻害率を確認する。

（４）多施設による抗ヒトＳ抗体阻害試験法の普遍性の確認を行う。

（５）常用基準法および自動化法の測定条件を設定し、測定値の比較試験を行う。

（６）参考基準範囲の設定を行う。

（７）実用標準物質の設定

10．まとめ

P 型アミラーゼの勧告法（常用基準法）は国際的にも例をみない。今回常用基準法作成に当たり考慮する点は、出来るだけシンプルな測定系を組み立てるために、S 型アミラーゼ阻害法を用いることとした。アミラーゼ活性の測定系は、総アミラーゼ活性と互換性を持つために、現在作成中の勧告法を用いることとした。

２－２－３－１３　血清Ｃ反応性蛋白質（CRP）

要　旨

１）ヒトCRP（C-Reactive Protein：C反応性蛋白）遺伝子を*E. coli*に組み込み、リコンビナントヒトCRP（rCRP）を作製、精製により高純度のrCRPを得た。

２）これを用いて、ヒトCRP実用標準物質および常用標準物質のプロトタイプを作製した。

３）ヒトCRP実用標準物質および常用標準物質の性状規格を設定した。

４）値付けのための基準測定法の検討に着手した。

５）標準物質の性能評価のため、準備を実施した。

１．はじめに

C反応性蛋白（CRP）は肺炎球菌のC多糖体と沈降反応をする酵素として発見され、IgMのように５個のサブユニットからなる、分子量105,000Daのタンパク質である。炎症や癌などで組織障害が起こると、活性化された単球／マクロファージはIL-6、IL-1、TNF-αなどを分泌する。とくにIL-6が肝細胞に結合してCRPの産生を誘導するため、組織障害があると、血中濃度が上昇する。

臨床的には、血清CRPの上昇は臓器非特異的反応であるが、組織損傷に敏感に反映するため、早期炎症マーカーとして広く利用されている。また、悪性腫瘍の進展に伴って上昇するので、広義の腫瘍マーカーとしても有用である。

また、最近、精密に血中CRPを測定して、虚血性心疾患（心筋梗塞）のマーカーとしても測定されている。この場合に用いる測定法は高感度と精密性が要求される（HS-CRP: High Sensitive CRP）。

２．目的

血清CRPは早期炎症マーカーとして臨床検査分野では日常的に測定されている。また、虚血性心疾患（心筋梗塞）マーカーとしての有用性が確認され、精密測定が重要視されている。

一方、CRPの世界的標準物質は常用標準物質として、CRM470が存在するが、本品は天然型CRPを原料とし、血清成分をマトリックス基材としている。ヒト組織（血清も含む）から調製された天然型CRPにはアイソフォーム(isoform)が存在することに加えて，免疫測定に影響を及ぼす不純物抗体が混在しており、天然型CRPを抗原として作製した抗体を用いた免疫測定法では抗原の免疫学的品質並びに抗体の品質による影響を受けるため、正確な物質量を反映しない場合が懸念される。

そのため、血清CRP測定用標準物質の開発においては、生物学的且つ免疫学的にヒトから最も遠く離れた位置づけにある*E. coli*を宿主とするDNA組換え手法で作製した遺伝子組み換え型ヒトCRP（rCRP）を用いて、世界のCRP標準物質としてのヒトCRP実用標準物質および常用標準物質を開発するものである。現時点においては血清CRPの基準測定法が制定されていないので、試料の濃度の値付けには国際的に汎用されているCRM470をキャリブレーターとして暫定的に実施するが、現在開発中の測定法が確立した時点で、実用標準物質に値付けを行い、これを基準物質として、実用標準物質→常用標準物質→測定試薬校正物質→臨床データへの値の伝達を確保し、

CRP 測定系を確立することを目的とする。

３．共同研究実施体制

日本臨床化学会　酵素･試薬専門委員会　CRP 標準物質作製プロジェクト（責任者:藤田　孝、藤田保健衛生大学臨床研究部）

研究協力先

藤田保健衛生大学病院
厚生連加茂病院
厚生連安城更生病院
千葉県循環器病センター
医療法人豊田会刈谷総合病院
名古屋大学医学部附属病院
豊田地域医療センター
名古屋臨床検査センター
厚生連足助病院
医療法人宏潤会大同病院
独立行政法人労働者健康福祉機構中部労災病院
愛知医科大学病院
東海市民病院
日本大学板橋病院
東京都立荏原病院
岡崎市医師会公衆衛生センター
豊橋市民病院
春日井市保健センター
㈱グッドライフデザイン
名古屋市立大学病院

４．標準物質の設定概要

（１）CRP 測定に関する調査結果（アンケート調査）

日本における CRP 測定に関してアンケート調査を実施した。

その結果、表１に示したように

- 回答数は 21 社、49 キットであった。
- CRM470 を用いていた。
- キャリブレーターの基材としてヒト血清が約 90%のキットに用いられていた。
- キャリブレーターに用いられている CRP の由来はヒト組織由来の天然型が最も多く、約 80%を占めていた。
- 今回調査したキットの内、最も低濃度まで測定できるのは 0.005mg/dl、最も高濃度まで測定出来るのは 144mg/dl であった。

（２）測定値の互換性の現状

測定の現状を平成 17 年度医師会サーベイ結果（2,784 施設参加）を表２に示す。使用されている試薬の 89.2%を占めるラテックス免疫測定法においては、試料 0.68mg/dl においては変動係数 CV＝3.8%であり、非常に良い結果である。これは標準物質 CRM470 による補正効果が大きい。また、2 種類の試料を測定した場合の双値図を図１に示したが、測定法間での収束性はあまり良好でなく、広く分布していた。

表１　CRP 測定に関してアンケート調査

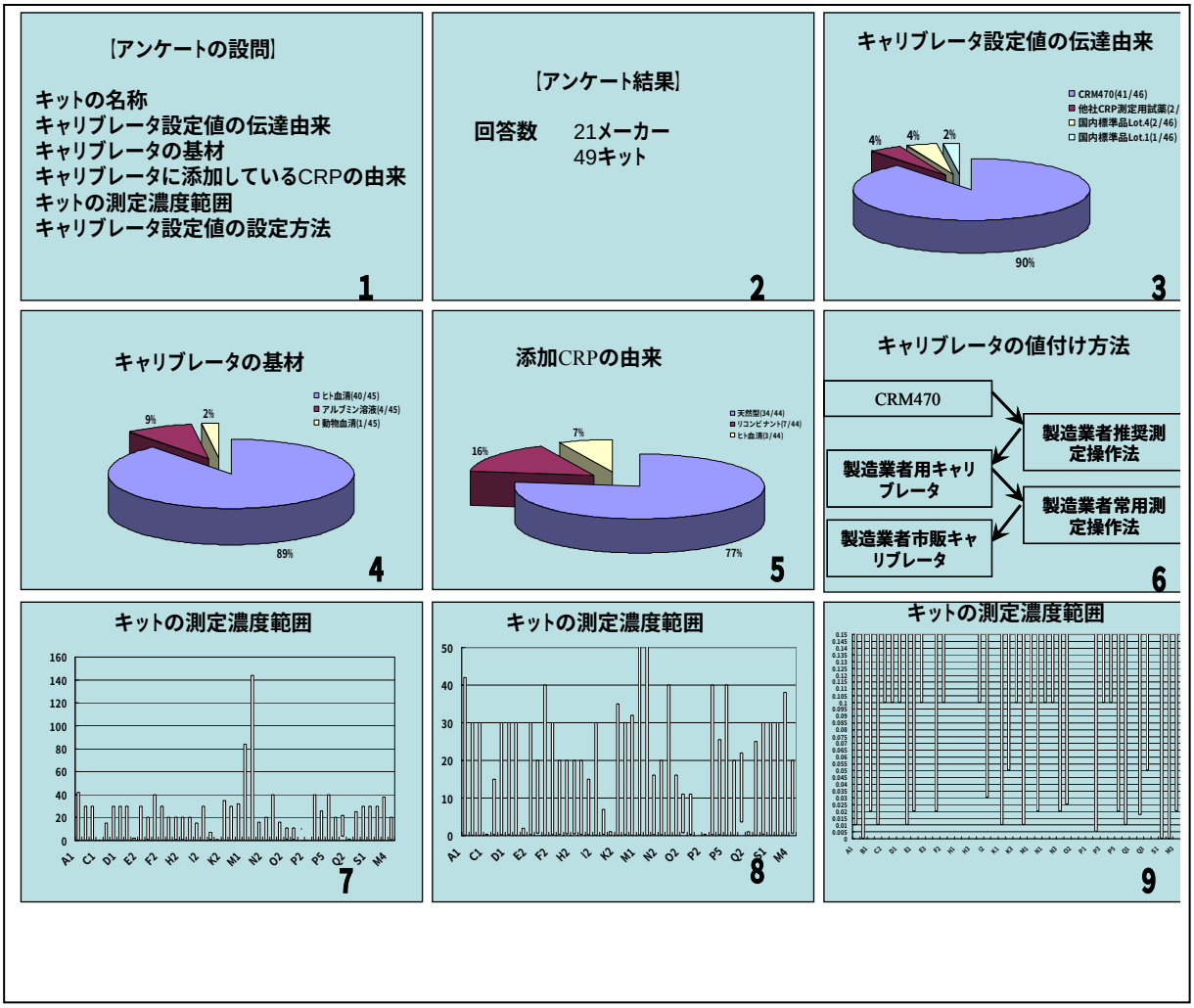


表２　CRP 測定の平均値と変動係数の推移（平成１７年度日臨技臨床検査精度管理調査報告書より抜粋）

測定法／年度	平成２	平成６	平成９	平成１２	平成１７
施設数	1700	2035	2244	2381	2784
TIA	2.59(46.9)	2.95（24.5）	3.24（7.5）	2.58（6.3）	0.67（7.8）
ﾗﾃｯｸｽ免疫非濁法	2.01（15.6）	2.52（15.1）			
LAIA-TIA			3.19（10.1）	2.63（3.9）	0.67（3.7）
LAIA-NIA			3.16（4.6）	2.55（3.6）	0.66（5.5）
比ろう法	1.57（12.6）	2.54（6.8）	3.09（7.0）		
全体＊	2.21(42.3)	2.77（22.4）	3.23（9.3）	2.61（5.9）	0.68（5.3）

＊　平均値（変動係数%）　　＊＊上記表中記載の方法以外の方法も含む

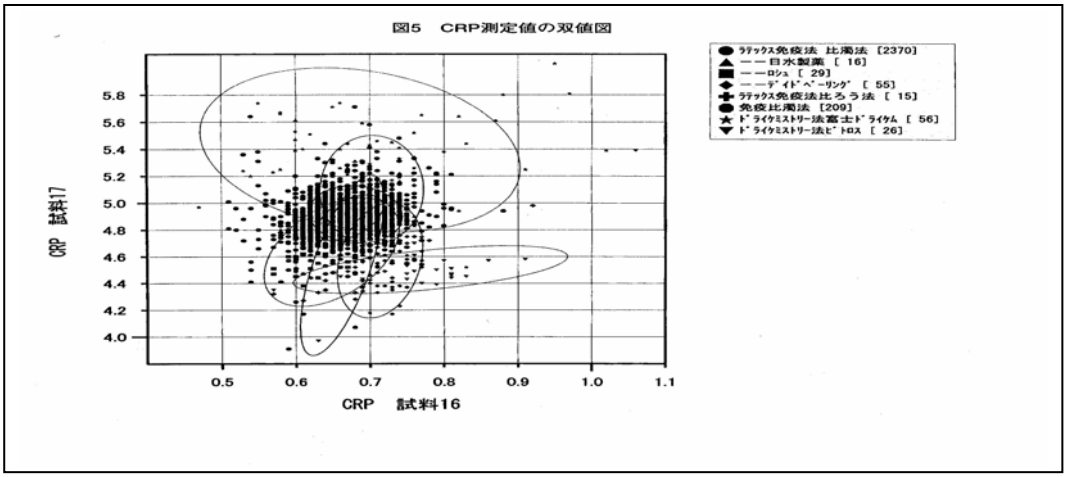


図１　CRP 測定値の双値図（平成 17 年度日臨技臨床検査精度管理調査報告書より）

（３）標準化および標準物質の設定経過

上述（２）に示したように IFCC による CRM470 の設定により、本標準物質による補正により良好な測定結果が得られている。しかし、測定法間においては測定値の収束性は決して満足出来るものでなく、より良い標準化を推進するためには相互互換性を確保出来る測定法および標準物質の開発が重要である。特に常用標準物質である CRM470 の上位に位置する実用標準物質の設定により、測定値の正確性の確保が今後の課題である。なお、CRP の測定体系を図２に示した。

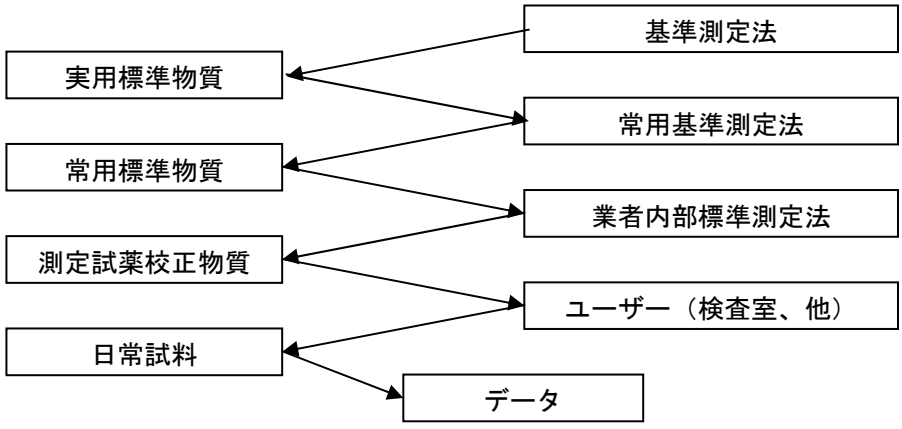


図２　CRP の測定体系

（４）実試料標準物質の設定

測定の正確性に影響を与える可能性のある不純物を含まない高純度 rCRP を実用標準物質として設定することにより、次に示す測定系を確立する。現在、高純度 rCRP を原料とした実用標準物質および常用標準物質を作製した。なお、これらの標準物質の性状規格は表４、５に示した。

（５）値付けの測定方法の選択

基準測定法は原則として、SI 単位に繋げる方法を選びたい。しかし、rCRP は高純度とはいえ、完全な純品ではない。それゆえ、重量測定による値付けは困難である。そのため、アミノ酸分析による方法を試みている。

５．実試料標準物質の作製プロトコル

（１）トレーサビリテイシステム

１）コミュータビリティの確認

基準測定法を日東紡績（株）製キットＮアッセイ LA CRP-S「ニットーボー（デイドベーリング社製 N-ラテックス CRPⅡ）で用い、各社キットとの相関を、血清検体 50 以上を用いて求める。このとき、試作した CRP 常用標準物質および CRM470 も同時に測定する。指定した施設（10 施設以上）で実施する。

２）　キャリブレーション効果の確認

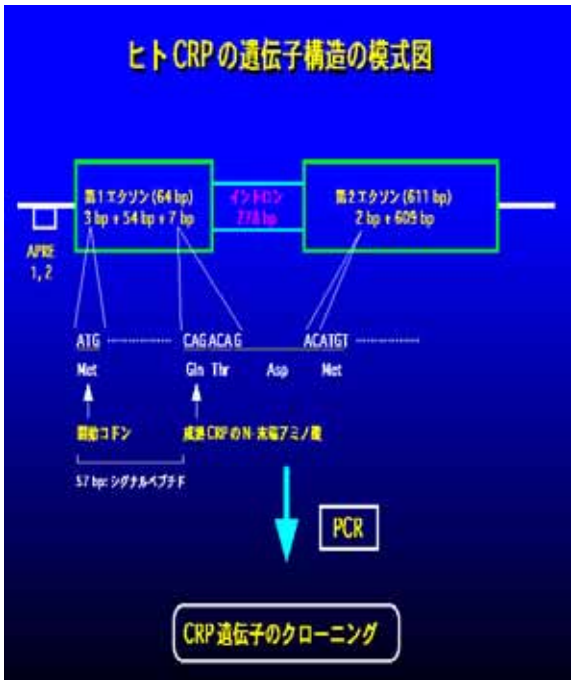
配布したプール血清（５種類）を各社測定キットで測定する。このとき、「各社測定キット添付の標準物質」および「試作した CRP 常用標準物質」を基準物質とした場合のデータを取る。実施施設は 20 以上とする。

（２）ヒトリコンビナント CRP（rCRP）の製造法および特性の概要

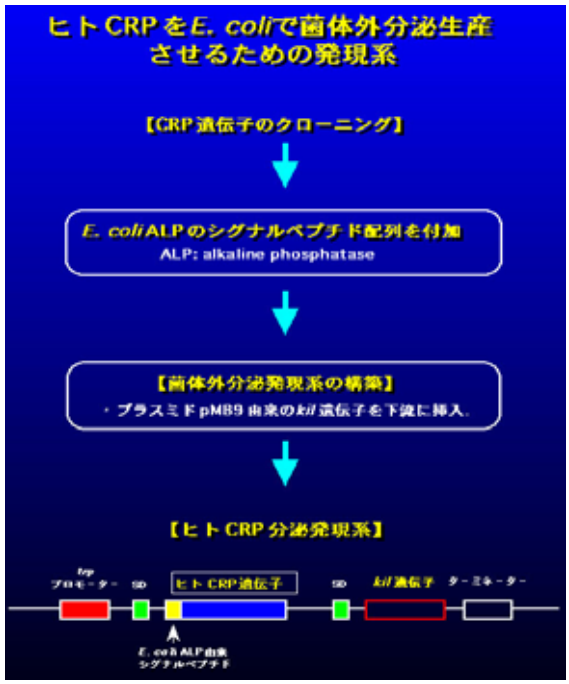
CRP は前立腺で産生される、アミノ酸 206 個（分子量 23,050Da）のポリペプチドからなるサブユニット 5 個からなる５量体蛋白質である。本物質は Ca^{2+} 存在下、ホスフォリルコリンとの結合能を持ち、生体の中では生体防御ウ機構と重要な役割を持っている。臨床検査の標準物質に用いられているものはヒト組織から分離精製されたものが用いられているが、供給量、バイオハザード、純度などの問題があるため、遺伝子組み換え技術によるヒト CRP の製造を試みた。まず、ヒト CRP 遺伝子を常法によりクローニングし、*E. coli* の組み込んだ。さらに、合成された CRP が *E. coli* の細胞外に分泌されるようにするため、*E. coli* のアルカリホスファターゼ由来のシグナル配列を CRP 遺伝子の上流に付加、*kil* 遺伝子を下流に挿入した（図３-１）。

この組み換え *E. coli* を約 40 時間培養後、培養上清より精製をして rCRP を得た。このものは図３-３に示すように、SDS-PAGE において、シングルバンドであり、非常に純度の高い標品を得た。本標品は表３に示すように天然型ヒト CRP と性質が一致し、各種測定試薬の標準物質としても、天然型 CRP とよく一致した（図３-５）。

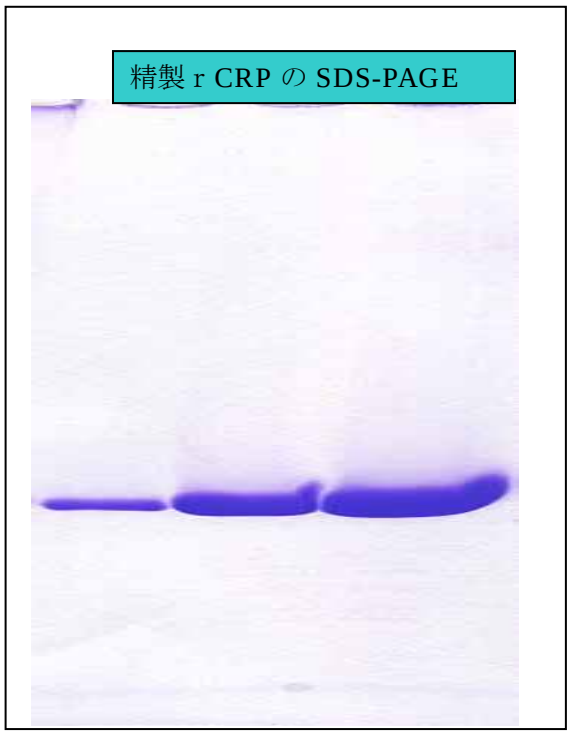
1


ヒトCRPの遺伝子構造の模式図
第1エクソン(64 bp)
3 bp + 54 bp + 7 bp
イントロン
第2エクソン(611 bp)
2 bp + 609 bp
APRF
1, 2
ATG
CAG ACA G
ACATGT
Met
Gln Thr
Asp
Met
開始コドン
成熟CRPのN末端アミノ酸
57 bp シグナルペプチド
PCR
CRP遺伝子のクローニング

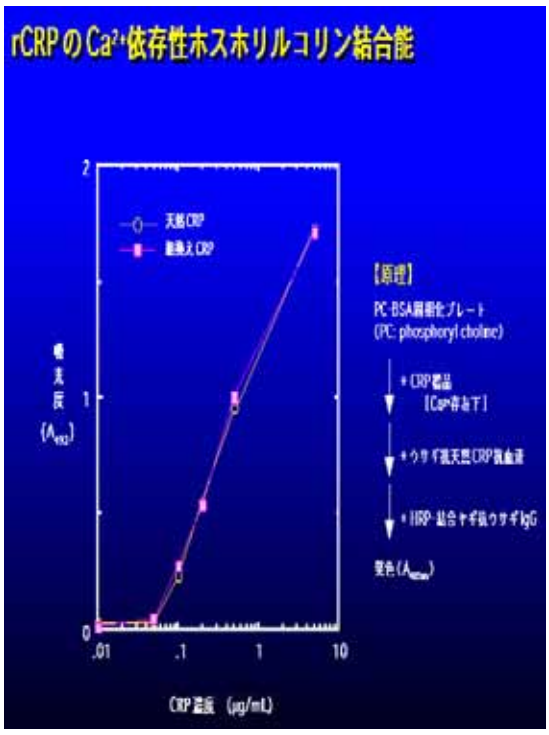
2


ヒトCRPをE. coliで菌体外分泌生産させるための発現系
【CRP遺伝子のクローニング】
E. coli ALPのシグナルペプチド配列を付加
ALP: alkaline phosphatase
【菌体外分泌発現系の構築】
・プラスミドpM89由来のkil遺伝子を下流に挿入.
【ヒトCRP分泌発現系】
trp プロモーター
SD
ヒトCRP遺伝子
SD
kil遺伝子
ターミネーター
E. coli ALP由来シグナルペプチド

3


精製 r CRP の SDS-PAGE

4


rCRPのCa2+依存性ホスホリルコリン結合能
2
1
0
.01
.1
1
10
天然CRP
【原理】
PC-BSA固相化プレート
(PC: phosphoryl choline)
CRP濃度 (μg/mL)

5　　6

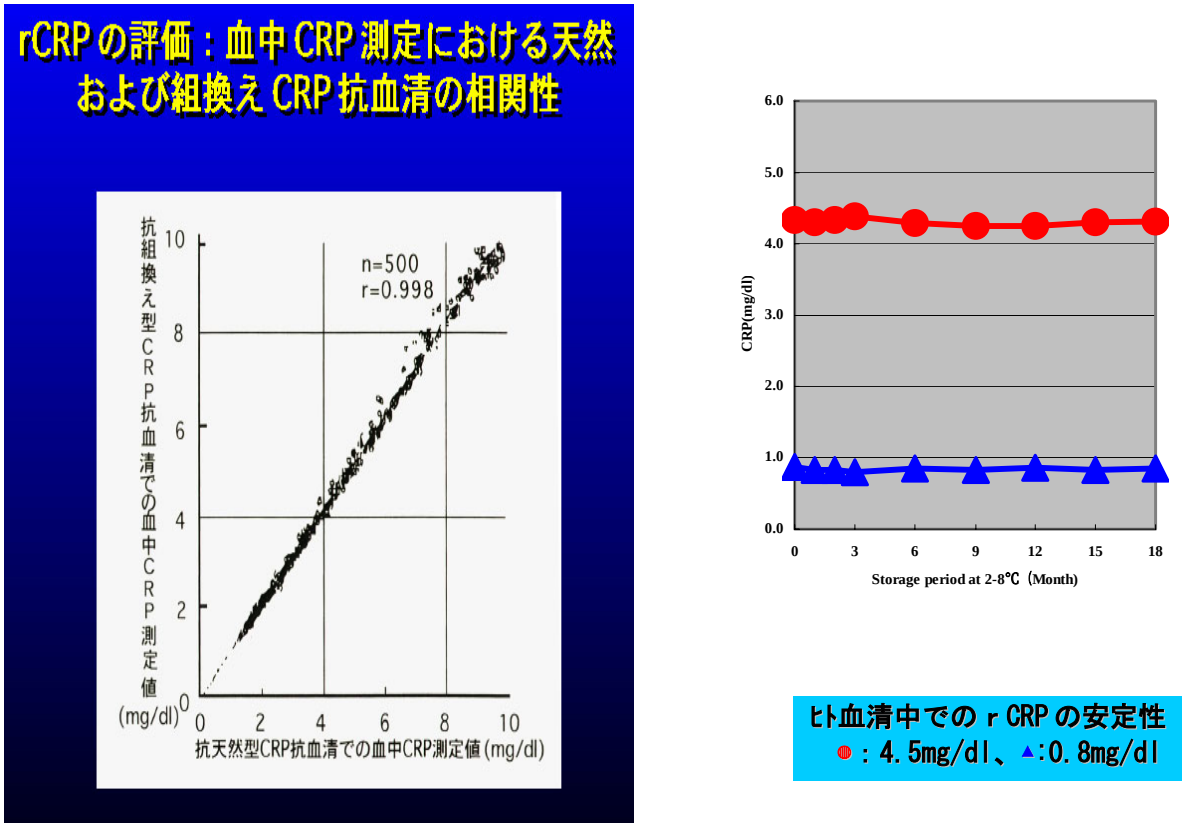


図３．rCRP の製造と評価

さらに、緩衝液溶液あるいは血清溶液状態で２-8℃において 18 ヶ月間は安定であった（図３-６）。なお、rCRP の生化学的性質を表３に示した。

表３　rCRP の生化学的性質

項　　目	rCRP	天然 CRP
分子量（モノマー）	23kDa	23kDa
高次構造	５量体	５量体
Ca^{2+}依存性 PC 結合能	あり（天然 CRP と同じ）	あり
電気泳動的性質	天然 CRP と同じ	－

（３）標準物質の性状規格

実用標準物質および常用標準物質の性状規格および作製した標準物質の評価結果を、それぞれ、表４、５に示した。作製した標準物質は両者とも規格を満たしていた。

表４　CRP 実用標準物質の規格

目	規　　格	確　認　値
1．適用範囲	本品はヒトの血清中ＣＲＰを測定する場合の 実用標準物質として使用することを目的とする。	
2．原料		
2－1．起源	組換えヒトＣＲＰを起源とする。	
2－2．基材	Tris buffer	規格に従う／適合
2－3．添加剤	安定化剤を添加する。	規格に従う／適合
2－4．感染物質	なし	
3．特性		
3－1．形状	液状品	規格に従う／適合
3－2．包装	ガラスバイアル（1mL）	規格に従う／適合
3－3．反応性	トＣＲＰと同様な挙動を示す。	規格に従う/反応性試験にて確認
3－4．物理学的性質		
3－4－1．分子量	SDS-PAGE で 23kDa である。	規格に従う／適合
3－4－2．純度	SDS-PAGE で単一バンドである。	規格に従う／適合
3－5．安定性		
3－5－1． 開封前の安定性	2年（10℃以下の冷蔵保存）	保存安定性試験にて確認
3－5－2 開封後の安定性	10 時間（10℃以下の冷蔵保存）	保存安定性試験にて確認
3－6．均一性	① 10 バイアルの3回反復測定を行う時、 バイアル間差は±2%以内である。 ② 不確かさを表記する。	規格に従う/適合
4．ＣＲＰ濃度	1.0±0.2mg/mL とする。 （1mg/mL： A280=1.7 より算出する。）	規格に従う／適合

表５　CRP 常用標準物質の規格

項　　目	規　　格	確　　認　　値
1．適用範囲	本品はヒトの血清中ＣＲＰを測定する場合　　の常用校正標準物質として使用することを 目的とする。	
2．原料		
2－1．起源	組換えヒトＣＲＰを起源とする。	
2－2．基材	ヒト血清（目視：濁り、高ビリルビン血清、溶血を認めない）	ヒト血清/適合
2－3．添加剤	安定化剤を添加する。	規格に従う/適合
2－4．感染物質	本品は、原料であるヒト血液のＨＢｓ抗原、ＨＣＶ抗体、HIＶ－1抗体および2抗体の 検査を行い、陰性の結果を得ていること。 注意）感染性物質の検査で陰性の結果を得ていても、感染の可能性を完全に否定できるものではありません。また、それ以外の感染性物質の検査は実施していませんので、感染の危険性があるものとして検体と同様に十分に注意して取り扱う。	規格に従う／適合
3．特性		
3－1．形状	凍結乾燥品	白色固形の凍結乾燥品/適合
3－2．包装	ガラスバイアル（1mL）	
3－3．反応性	ヒトＣＲＰと同様な挙動を示す。	規格に従う/反応性試験にて確認
3－4．物理学的性質		
3－4－1．分子量 3－4－2．純度	SDS-PAGE で 23kDa である。 SDS-PAGE で単一バンドである。	規格に従う/適合 規格に従う/適合
3－5．安定性		
3－5－1． 開封前の安定性	2年（10℃以下の冷蔵保存）	保存安定性試験にて確認
3－5－2． 開封後の安定性	10 時間（10℃以下の冷蔵保存）	保存安定性試験にて確認
3－6．均一性	① 10 バイアルの3回反復測定を行う	規格に従う/適合

	時、 バイアル間差は±2%以内である。 ② 不確かさを表記する。	
4．CRP濃度	**使用時に 5.0±1.0mg/dL とする。（Dade 社 BN II にて測定する。）**	**規格に従う/適合**

（4）基準測定操作法

実用標準物質の値付けのための基準測定操作法については検討中である。

（5）値付け

実用標準物質への値付けは（4）記載の方法の開発を待って実施する。

一方、常用標準物質は実用標準物質の値付けが終了するまでは CRM470 を基準物質として、暫定的に日東紡績（株）（デイドベーリング）のキットを用い、指定した施設（20 施設以上）で実施する。

6．今後の課題

（1）実用標準物質の値付けのための基準測定操作法の確立

（2）実用標準物質から常用標準物質への値付けのための標準測定法の確立。

（3）トレーサビリティの確認

7．結び

ヒト CRP 標準物質の作製はプロトタイプを作製した。今後これらの標準物質の値付け、評価をした後、JCCLS の認証を得る。さらに、JCTLM へ国際標準物質としてノミネーションする。

２－２－４　国際標準化への対応

要旨

１）新たに設定された実試料標準物質について JCTLM へノミネーションするために必要な文書の英文化の作業を行った。

２）文書の英文化は、値付けの方法、認証書および取扱説明書についてであり、血液ガス、グルコース、尿酸、クレアチニンおよびイオン化カルシウムの測定項目であった。

３）JCTLM へのノミネーション Cycle Ⅲへは、グルコース、尿酸およびクレアチニンの実試料標準物質（常用）について行った。

１．目的

グローバルスタンダードとしての測定法、標準物質、情報システム、品質システム、安全システム、環境システムなどが準備されている。このうち標準物質関係については、トレーサビリティの確保が重要であることから、標準化を推進する国際機関による JCTLM（検査医学のトレーサビリティに関する合同委員会）で集約することとなった。

2002 年 BIPM（国際度量衡局）において、BIPM と IFCC の共催で「Symposium on Traceability in Laboratory Medicine」と称する国際会議が開催された。参加団体はヨーロッパ、米国、日本における臨床検査医学に関係する政府機関、学会、標準物質供給機関および関連企業団体等であった。日本からは厚生労働省、経済産業省、産業技術総合研究所、日本臨床化学会、福祉・医療技術振興会および（社）日本臨床検査薬協会等の代表者が参加した。

この会議において、検査医学のトレーサビリティに関する合同委員会（JCTLM）が発足することが合意された。主たる内容はトレーサビリティをとる標準物質の設定である。発起機関は４つの国際的および政府間の推進母体として、BIPM/CIPM（Bureau international des poids et measures:：国際度量衡局/Comite international des poids et mesures：国際度量衡委員会)、IFCC、WHO、ILAC （International Laboratory Accreditation Cooperation：国際試験所認定機構）であり、これに参加各国の協力機関で推進する。

本活動を通して、患者のための保健医療（Healthcare）の質の向上、繰り返し検査の減少と保健医療の効率性の向上によるコストの削減、IVD 企業のためのコスト削減、地域標準の統一化による重複した規格の除去、測定と検査のグローバルな承認を通して貿易の技術的障壁の除去などを図る。

具体的に標準化を推進する方法として、原則的には認証標準物質（Certified Reference Materials: CRM）および基準測定操作法（Reference Measurement Procedure: RMP）が存在し、それらを使用して基準測定検査室（Reference Measurement Laboratories: RML）が測定した測定値を介して、各国・各地域の RML が相互に標準化の確立を行うことである。

２．検討内容

日本臨床化学会の血液ガス・電解質専門委員会（現 POPCT 専門委員会：委員長桑　克彦）および酵素・試薬専門委員会（委員長美崎英生）において進められてきた標準物質の設定作業について、値付けの方法、標準物質の認証書および取扱説明書の各文書を英文化した。

測定項目ごとに英文化したタイトルは以下のごとくであった。

（1）血液ガス

1）値付けの方法

A working reference material for blood gas measurements：Procedure for preparation, accuracy confirmation and calibration

2）認証書および取扱説明書

Certificate of Analysis ： Reference Material for Blood Gas Measurement

（2）グルコース

1）値付けの方法

Recommendation method for the determination of serum glucose

2）認証書および取扱説明書

Certificate of Analysis ： Certified Reference Material for Measurement of Glucose in Human Serum

（3）尿酸

1）値付けの方法

Recommendation method for the determination of uric acid in serum by HPLC

2）認証書および取扱説明書

Certificate of Analysis：Certified Reference Material for Measurement of Uric Acid in Human Serum

（4）クレアチニン

1）値付けの方法

Recommendation method for the determination of creatinine in serum by HPLC

2）認証書および取扱説明書

Certificate of Analysis：Certified Reference Material for Measurement of Creatinine in Human Serum

（4）イオン化カルシウム

1）値付けの方法

Recommendation method for the determination of blood concentration of ionized calcium by ion selective electrodes ： Measurement system and calibration using reference serum

2）認証書および取扱説明書

Certificate of Analysis ： Certified Reference Material for Measurement of Electrolytes

3．結果

準備した英文のドキュメントおよび認証書とJCTLMノミネーションCycle Ⅲのリストを表1に示した。4種の測定項目について英文化を行い、うちJCTLMへのノミネーションCycle Ⅲへは、グルコース、尿酸およびクレアチニンの実試料標準物質（常用）について行った。

表１　英文のドキュメントおよび認証書の準備とJCTLM対応

測定項目	値付けの方法	認証書・取扱説明書	JCTLM ノミネーション Cycle Ⅲ(2006.4)
血液ガス	○	○	ー
グルコース	○	○	○
尿酸	○	○	○
クレアチニン	○	○	○
イオン化カルシウム	○	○	ー

４．今後の課題

JCTLM へのノミネーション Cycle Ⅳへは、血液ガスおよびイオン化カルシウムの実試料標準物質（常用）について行宇準備ができた。さらに平成 18 年度の研究開発で実試料標準物質の設定が予定されるヘモグロビン A!C（HbA1ｃ）、総カルシウム、総マグネシウム、血清鉄、尿素窒素、コリンエスレラーゼ、アルブミンなどについて JCTLM へのノミネーションを準備する。

５．まとめ

設定された実試料標準物質について JCTLM へノミネーションするために必要な文書の英文化の作業を値付けの方法、認証書および取扱説明書について血液ガス、グルコース、尿酸、クレアチニンおよびイオン化カルシウムの測定項目について行った。このうち JCTLM へのノミネーション Cycle Ⅲへは、グルコース、尿酸およびクレアチニンの実試料標準物質（常用）について行った。

２－３　純物質系標準物質の研究開発

要旨

１）値付けの基準となりうるC反応性蛋白標準物質の開発を目指し、候補品としては、組換え型ヒトC反応性蛋白緩衝溶液を選定した。

２）値付け方法については、アミノ酸分析法および窒素分析法（ケルダール法、燃焼発光式窒素分析法等）の適用の可能性について検討し、さらに、具体的な分析条件などについて詳細に検討を行った。

３）C 反応性蛋白溶液を用いた予備検討において、アミノ酸分析法と窒素分析法でほぼ一致する結果を得ることができた。また、安定性試験に向けて、試験方法の検討を行い、カラムクロマトグラフィおよびアフィニティクロマトグラフィによる方法の確立を行った。

２－３－１　研究背景

産業技術総合研究所計量標準総合センターでは、定量分析の基準となる標準物質の開発を進めており、これまでに一次標準測定法を用いて環境分析用を中心とする有機化合物に関する純物質標準物質や組成標準物質の開発と供給を行ってきた。

臨床検査用標準物質については、代謝物に代表される低分子の有機化合物については、国際度量衡委員会物質量諮問委員会(CIPM/CCQM)で定義されている一次標準測定法によりトレーサビリティの確保されうる測定体系の構築が原理的に可能であると考えられるが、蛋白質などの生体高分子については、現状の一次標準測定法は直接的には適用できない。

そこで、本研究では、蛋白質における国際単位系（SI）トレーサブルな測定体系について検討するとともに、それらを用いた純物質系標準物質の開発を目標にした。SI トレーサブルといえる蛋白質標準物質は世界的にもまだ例のないものであり、CCQM においても、蛋白質の SI トレーサブルな定量方法に関する議論が行われているところである。

平成１17 年度は、C 反応性蛋白について、値付けの基準となりうる標準物質の開発を目指して候補物質の選定、値付け方法の検討、安定性試験方法についての検討を行った。なお、C 反応性蛋白については、本プロジェクトの「実試料系標準物質の研究開発」において、血清ベースの標準物質開発を行っており、純物質系標準物質として開発するC反応性蛋白標準物質は、最終的には実試料系標準物質の値付けの基準にすることを目標にしている。

研究担当者：産業技術総合研究所計測標準研究部門有機分析科バイオメディカル標準研究室
高津章子、加藤愛、加藤尚志
産業技術総合研究所計測標準研究部門有機分析科
加藤健次

２－３－２　C 反応性蛋白

１．序論

C 反応性蛋白 (CRP)は急性期反応蛋白の代表的な成分であり、感染、組織障害などの侵襲に対する炎症反応の生体分子マーカーとして臨床的に広く利用されている。炎症初期応答時には CRP の血中レベルは健常人の数十～数百倍に増大するため（他の急性期反応蛋白は 2～５倍)、体内の炎症、組織障害などの指標として極めて有用である。近年、動脈硬化症の発症・進展には慢性の炎症反応の持続が密接な関係も持つと考えられることから、微量（低濃度）の血清 CRP 測定値の臨床的意義が注目されている。CRP の主な性状と病的意義などについては表１に記した。

表１ CRP の性状と病的意義

アミノ酸数	**206 個**
サブユニット分子量	**23 kDa**
糖鎖	**なし**
存在形態	**5 量体**
合成部位	**肝細胞**
生理的レベル	**0.1～0.2 mg/dL**
病的意義	**炎症初期免疫応答**

２．候補標準物質の選定

純物質系蛋白質標準物質に求められる条件として、主に（１）生化学的均質性が高いこと、（２）純度が高いこと、（３）安定的供給が可能であること、の 3 点が挙げられる。（株）オリエンタル酵母のリコンビナント型ヒト CRP は、大腸菌を宿主として単一の遺伝子から遺伝子工学的に産生した蛋白質であるために、血清を原材料とした精製品に比較して生化学的均質性が高い。また、菌体外への分泌発現型の蛋白質であるため、夾雑物が少ない状態からの精製が可能であり、MALDI-TOF/MS 分析を行った結果、非常に高純度に精製できていることが確認されている[1)]。同社は上記の生産系を 150 ℓタンクにスケールアップし、約 2 週間で培養、精製を終えるシステムを構築し、既に 10 年以上にわたって高純度でロット差のほとんどない製品の安定供給を続けている。

また今回のプロジェクトにおいては上記の 3 つの条件に加えて、臨床の現場で直接使用可能な、臨床分野で多用されている免疫測定法に対して天然型 CRP と同等の反応性を示す標準物質が求められていた。オリエンタル酵母工業（株）の報告によれば、リコンビナント型 CRP は天然型と同様に、Ca^{2+}存在下でホスホリルコリンや 6－アミノカプロン酸と結合し、またリコンビナント型をウサギに免疫して得られた抗血清は天然型と同等の抗原性を示した[1)]。また、他の（天然型を含む）CRP 標準物質との同等性に関する報告もある[2)]。以上のような理由から、オリエンタル

酵母工業（株）のリコンビナント型ヒト CRP を候補標準物質として選定した。

なお、オリエンタル酵母工業（株）の製品は、緩衝液に溶解した溶液（濃度約１ mg / mL、溶液組成は、20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.14 M NaCl、2 mM $CaCl_2$、0.05 % NaN_3）である。この製品について得られている知見を最大限活用し、迅速な供給開始を目指すという観点からも、この溶液を候補標準物質として検討を行うことにした。

３．濃度決定に関する基礎的検討

CRP 標準物質の濃度決定においては、化学量論的に正確な値付けを行う必要がある。また蛋白質を乾燥するなどして高次構造が壊れてしまった場合、標準物質として使用することが難しくなるため、濃度決定は蛋白質溶液のまま行うのが望ましい。

以上 2 つの条件を満たす測定方法として、アミノ酸分析法と窒素分析法が考えられる。本研究では CRP の定量に先立って、各々の方法における測定条件を確立し、定量性、再現性の検討を行った。

（１）アミノ酸分析法による蛋白質定量

アミノ酸分析による蛋白質定量においては、蛋白質を基本構成単位であるアミノ酸にまで分解後、それぞれのアミノ酸を HPLC で分離定量し、その結果からもとの蛋白質量を求める。換算にあたっては、蛋白質の分解過程で同時に分解してしまうアミノ酸もあるため、個々のアミノ酸の定量結果から、一次構造をもとに計算される各々のアミノ酸の蛋白質１分子に含まれる割合を元に蛋白質量を求めることにした。アミノ酸分析法はこれまで蛋白質の同定のための定性的な測定法として用いられるケースが多く、その定量性や再現性に関しては改めて詳細な検討が必要であると考えた。今回は特にそれらに影響を与えると思われる、内部標準の有無、試料量、加水分解時間、蛋白質量を換算する際のアミノ酸の種類等の条件について検討を行った。

１）実験方法

①内部標準の有無に関する検討

分解法としては 6 N HCl を用いた気相加水分解法を用いた。分解産物であるアミノ酸は AQC（6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate）で誘導体化後、逆相 HPLC（装置は日本ウォーターズ社製 Alliance 2695、カラム・移動相は AccQ・Taq システム（Waters））で分離し、蛍光検出器を用いて検出・定量した。内部標準の有無に関しては、内部標準物質としてα―アミノ酪酸（AAbA)もしくはノルロイシンを使用した場合とそうでない場合の定量性や定量結果について検討した。

②試料量に関する検討

測定系に関しては①と同じものを用い、検討用試料として、0.5 μg 相当、1.5 μg 相当、4.5 μg 相当のウシ血清アルブミン溶液を 110 ℃で 24 hr 加水分解し、各々の測定値 / 秤量値について

比較検討した。

③加水分解時間に関する検討

測定系に関しては①と同じものを用い、1.5 μg 相当のウシ血清アルブミン溶液を、110 ℃で 8 hr、16 hr、24 hr、48 hr、72 hr、96 hr と時間を変えて加水分解した場合の各々の測定値 / 秤量値について比較検討した。ただし 8 hr、16 hr、24 hr の加水分解と 24 hr、48 hr、72 hr、96 hr の加水分解は別の日に行った 。

④蛋白質量を換算する際のアミノ酸の種類に関する検討

③の結果を換算する際のアミノ酸の種類別に見た場合の、各々の測定値 / 秤量値やデータのばらつきについて比較検討した。

２）結果および考察

0.5 μg 相当、1.5 μg 相当、4.5 μg 相当のウシ血清アルブミン溶液を 110 ℃で 24 hr 加水分解し、内部標準物質を使用した場合とそうでない場合の各々の定量性について比較したところ、いずれも良好な直線性（$r^2 > 0.99$）を示したが、回収率（測定値/秤量値）に関しては内部標準を用いた場合の方が用いない場合に比べて若干高かった。

また、用いる試料量に関しては１～1.5 μg（蛋白量）を加水分解した場合に回収率が最大になった（図１）。

加水分解時間に関しては、24 hr で回収率が最大になり、かつ、おおまかには換算する際のアミノ酸の種類の違いによらない結果が得られた（図２）。但し、最終的に正確な蛋白質の量を算出する際の換算に用いるアミノ酸の種類に関しては、さらに細かく検討する必要がある。

上記の結果を踏まえ、試料量については１～1.5 μg（蛋白量）を、110 ℃で 24 hr 加水分解し、ノルロイシンを内部標準として定量を行うことにした。

図１　試料量、定量法ｖｓ回収率(測定値 / 秤量値)

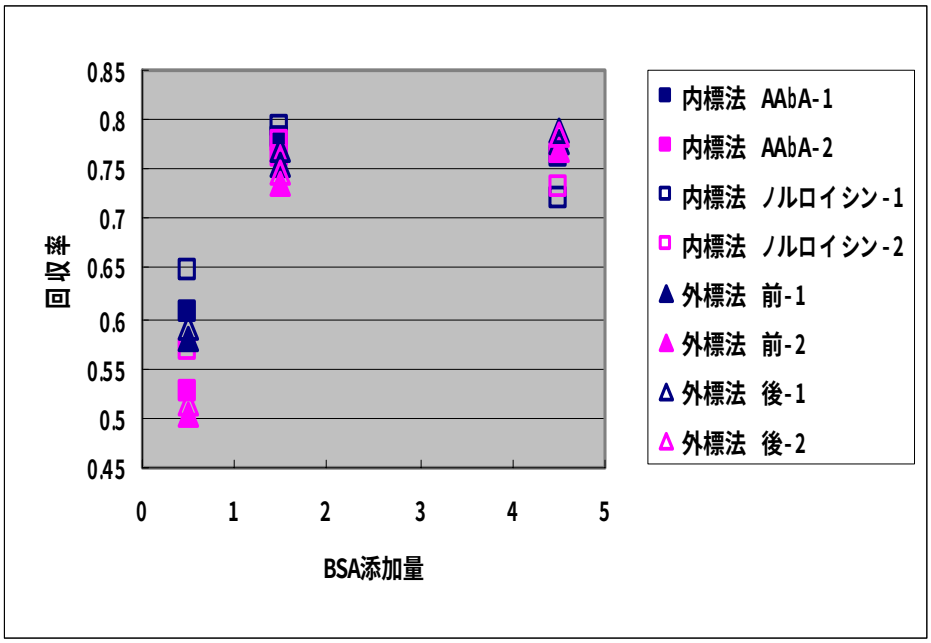
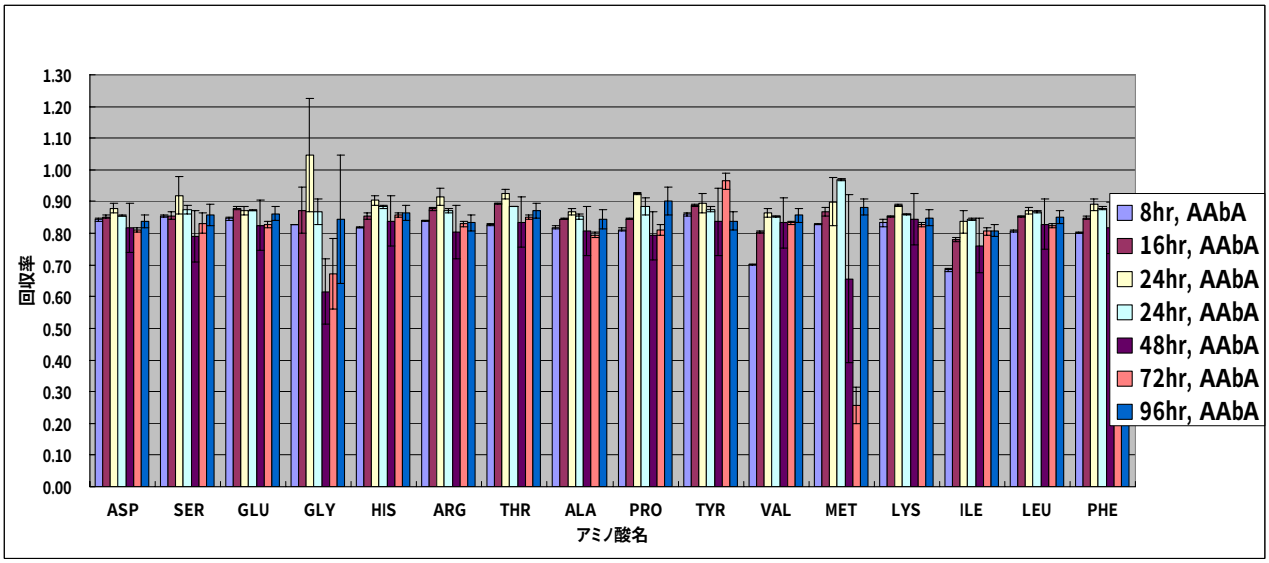


図２　加水分解時間 vs 回収率(測定値 / 秤量値)



（2）窒素分析法による蛋白質定量

窒素は、生体高分子の中で、炭水化物や脂質には含まれず、蛋白質に固有に含まれる原子であることから、汎用的にも蛋白質の定量に用いられている方法である。測定により得られた窒素量に、「目的蛋白質の分子式より求められた理論的窒素含量」の逆数をかけることで、蛋白質の定量を行うことが出来る。窒素分析法は原理の違いにより、ケルダール法、デュマ法、燃焼式発光法の 3 つに分けることが出来る。今回は各々の方法を網羅する形で、計６つの分析器について同一の試料を測定し、感度、再現性について比較検討を行った。

１）実験方法

①　ケルダール法

本法は、蛋白質試料を熱濃硫酸により分解してアンモニアとし、NH_4^+の形で滴定により定量する方法である。滴定用の酸として、化学量論的に正確な値付けしたものを用いれば、原理的には SI トレーサブルな測定が可能となる。分析装置は加熱分解装置・ケルダーム KBBS（ゲルハルト社）および水蒸気蒸留装置・ペーパデス VAP30（ゲルハルト社）を用いた。試料は約 200 mg の凍結乾燥したウシ血清アルブミンを秤量後、濃硫酸中で加水分解を行い硫酸アンモニウムを生成した。得られた分解液を強アリカリ性として、水蒸気蒸留法によってアンモニアを蒸留しホウ酸液に捕集後、アンモニアとホウ酸の反応で生じたホウ酸アンモニウムを 0.1 N 硫酸での滴定またはイオンクロマトグラフィー（ICS-2000；日本ダイオネクス社)により定量し、試料由来の窒素量を求めた。蛋白量は得られた窒素量をもとに換算して求めた。

②　デュマ法

本法は、蛋白試料を燃焼させて得られた N_2 ガスをガスクロマトグラフィーにより定量する方法である。予め適当な窒素標準物質を用いて作成した検量線を用いて、試料中の窒素の定量が行われる。分析装置は EA1110(CE Instrument 社)を用いた。

標準物質としてはシクロヘキサノン　2，４－ジニトロフェニルヒドラゾン（Thermo）を用いた。試料は約 2 mg の凍結乾燥したウシ血清アルブミンを秤量後、高温で試料を完全燃焼させた。燃焼によって生成したガスはキャリアガス（ヘリウム）によって還元管内に送られ、NO_X は N_2 に還元後、ガスクロマトグラフィにより分離精製され熱伝導度検出器（TCD）により検出した。測定値は得られた窒素含有量(%、重量パーセント)をもとに換算して求めた。

③　燃焼式発光法

本法は、蛋白質試料を酸化させて得られた励起状態の NO_2 ガスが、基底状態に戻る際の発光により定量する方法である。予め適当な窒素標準物質を用いて作成した検量線を用いて、試料中の窒素の定量が行われる。分析装置は TN-100(DIA Instrument 社)を用いた。標準物質としては硫

酸アンモニウム（和光純薬）を用いた。試料は約 100 mg の凍結乾燥したウシ血清アルブミンを秤量後、超純水に溶解して蛋白質溶液を調整した。各々の蛋白質溶液、10～20 μl を高温に加熱された反応炉（反応炉１：600 ℃、反応炉 2：800 ℃）に注入し、試料中の窒素化合物を NO_2 に変換した。NO_2 が基底状態に戻る際の発光は光電子増倍管により検出した。試料の測定値は得られた窒素濃度をもとに換算して求めた。

２）結果および考察

上記 3 種の方法を網羅する計６つの分析器について同一の試料を測定したところ、燃焼式発光法が最も高感度に蛋白質を溶液の状態で測定できることが分かった。また、回収率（測定値 / 秤量値）を比較したところ、E 社の分析器は他の測定原理をもつ A 社、B 社と同等の値を示すことがわかった。またこの値はアミノ酸分析法により得られた値ともほぼ一致した（表２）。したがって、蛋白質溶液の測定には燃焼式発光法を用いることにした。

なお、ケルダール法は、最終的な測定を滴定法で行えば窒素の標準物質を必要としないため、燃焼式発光法において用いる標準物質の窒素量を決定するのに最適であると考えられる。

表2　各方式の窒素分析計による測定結果の比較

メーカー	サンプル量（蛋白質相当量）	回収率（測定値 / 秤量値）	RSD, %
A 社　(ケルダール法)	～200mg　(BSA 粉末試料)	0.877	0.503
B 社　(デュマ法)	～2mg　(BSA 粉末試料)	0.889	0.418
C 社　(燃焼式発光法)	～10μg　(BSA 液体試料)	0.954	0.51
D 社　(燃焼式発光法)	～10μg　(BSA 液体試料)	0.655	0.179
E 社　(燃焼式発光法)	～10μg　(BSA 液体試料)	0.889	1.98
F 社　(燃焼式発光法)	～10μg　(BSA 液体試料)	0.732	-

（３）CRP 溶液の試験的定量

上記 2 つの濃度決定法および汎用的に用いられる吸光度測定法を用いて、候補標準物質と同様の組成の CRP 溶液の定量を行い、各々の測定値の比較検討を行った。なお、前述したとおり、候補標準物質とする予定の CRP 溶液は、緩衝液や保存剤として窒素化合物を含むため、直接窒素分析を行うことができない。そこで、窒素含有成分を含まない CRP 溶液を調製して、あわせて測定を行った。

１）実験方法

① 吸光度測定法

窒素成分（Tris, NaN_3）を含む通常の CRP 溶液と窒素含有成分を含まない CRP 原液を、濃度約 0.1 mg/mL 、約 0.2 mg/mL、約 0.3 mg/mL に希釈後、λ max = 280 nm で紫外光の吸光度を測定した。分光光度計は UV-2550（島津）を用いた。測定結果に基づく蛋白質溶液の濃度計算は下記の式により行った。なお、 CRP のε（吸光係数）は文献4の値を参照した。

CRP 濃度（mg/mL）＝ $A_{280}/\varepsilon \cdot \ell$＝（吸光度の測定値）/ (ε・ 1)

② アミノ酸分析法

①で調製した CRP 希釈溶液について、各々10 μl（1～3 μg 相当）を分析に供した。加水分解は 110 ℃で 24 hr 行い、3. (1)で述べたのと同様の方法で分析した。

③ 窒素分析法

①で調製した窒素含有成分を含まない CRP 溶液の希釈溶液について、各々15 μl（1.5～4.5 μg 相当）を分析に供した。分析方法の詳細については 3. （2） 1) ③と同様に行った。

２）結果および考察

上記 3 種の方法を用いた測定結果を比較した結果については表 3 に示した。

通常の（窒素成分含有）溶液においては、全ての濃度についてアミノ酸分析と吸光度測定による結果はほぼ一致した。窒素含有成分を含まない CRP 溶液 0.3 mg/mL 当においては、アミノ酸分析と窒素分析から求めた濃度はほぼ一致したものの、吸光度での測定値よりはやや低かった（吸光度測定では低濃度サンプルのバックグラウンドが高く、測定不能）。また、窒素分析においては低濃度のサンプルの燃焼効率が悪いのか、アミノ酸分析の結果に比べ低い測定結果が得られた。

上記の結果から、アミノ酸分析と窒素分析で測定を行った場合、各々の測定結果はほぼ一致することが確認できたが、詳細についてはさらに検討を行う必要がある。

表 3 CRP 溶液の試験的定量結果

	およその試料濃度	アミノ酸分析 (mg/mL)	窒素分析 (mg/ mL)	吸光度（ε = 1.7) (mg/ mL)
窒素成分なし	0.1mg/mL 相当	0.08	0.03	-
	0.2mg/mL 相当	0.14	0.11	-
	0.3mg/mL 相当	0.24	0.23	0.31
窒素成分含有	0.1mg/mL 相当	0.07	-	0.1
	0.2mg/mL 相当	0.18	-	0.21
	0.3mg/mL 相当	0.28	-	0.32

４．安定性評価に関する基礎的検討

標準物質として供給していくためには、供給している間の試料の安定性を保証する必要がある。

そこで、CRP 溶液を長期間保存した場合の安定性を評価するにあたり、純度安定性評価のための測定系の開発を行った。純度安定性評価は概ね生化学的にどの程度安定かをみる生化学的安定性評価と、抗原抗体反応を起こすのに十分な立体構造をとっているかをみる免疫学的安定性評価に分けられる。前者の評価方法として、カラムクロマトグラフィ、電気泳動分析法について、後者の評価方法としてアフィニティクロマトグラフィについての測定条件の確立を行った。

（1）ゲルろ過

ゲルろ過は、蛋白質の分子サイズの差を利用して分離する手法で、蛋白質の高次構造を破壊しないで分離分析できるという利点がある。同分析においては、未変性条件下で目的蛋白質および目的外蛋白質の分子量の推定および相対的存在割合を調べることが出来る。今回は CRP の溶離条件を確立後、定量性と再現性の確認、凍結融解サンプルを用いた測定系の評価を行った。

1）実験方法

① 溶離条件の確立

Morimatsu M.ら [4] の文献を参考に以下のような溶離条件の確立を行った。LC は日本ウォーターズ社製 Alliance2695 を用いた。カラムは I.D. 4.6×30 mm の TSK-super SW 3000 (TOSOH) を、移動相は 0.1 M Tris-HCl－0.15 M NaCl－1 mM EDTA（pH 7.5）を用い、流速 0.1 mL/ min のアイソクラティックモードによる分離を行い、UV 検出器（日本ウォーターズ社製）を用いてピーク検出を行った（λmax ＝ 280 nm）。

② 定量性と再現性の確認

CRP 溶液原液を 5 μg 相当、10 μg 相当、20 μg 相当注入し、各々3 回ずつ分析した場合のピーク面積もしくはピーク高さをもとに、定量直線性および定量再現性の確認を行った。

③ 凍結融解サンプルを用いた測定系の評価

蛋白質溶液の凍結融解を繰り返すと、蛋白質は部分的に分解することが知られている。そこで凍結融解サンプルを用いて、本測定系がサンプル中の未分解 CRP を定量するのに使用できるかどうかの評価を行った。凍結融解サンプルの調製は以下のように行った。まず CRP 溶液を適当量ずつエッペンドルフチューブに小分けにし、液体窒素中に数分浸漬して溶液を完全に凍結させた。その後、凍結試料を室温に 0.5～1 hr 放置して液体にまで融解した。以後この操作を繰り返し、凍結融解回数が 2 回、5 回、10 回のサンプルを調整した。10 μl の各凍結融解サンプルに等量の HPLC 用蛋白質分子量マーカー（オリエンタル酵母）を内部標準として加え、よく混和した後に分析に供した。

２）結果および考察

上記の方法で分離分析を行ったところ、HPLC 用蛋白質分子量マーカー由来の 5 種の蛋白は良好に分離し、CRP は単一のバンドとして検出することが出来た（図３）。また、同一の条件下で、複数回注入を行ったところ、$r^2 > 0.999$ の高い定量直線性と、RSD ≒ 0.3（20 μg 相当をアプライ時）の高い再現性を得られることが分かった（表４）

凍結融解サンプル中の未分解 CRP の定量を行ったところ、凍結融解回数が増えるにつれて未分解な CRP の量は漸次減少していく様子が見て取れた（図４）。

上記の結果より、本測定系は候補標準物質（CRP）の生化学的安定性を評価するのに十分な分離能、定量性を有しているものと結論付けた。

図 3 ゲルろ過 HPLC を用いた分離 ((a) CRP, (b) Protein MW marker)

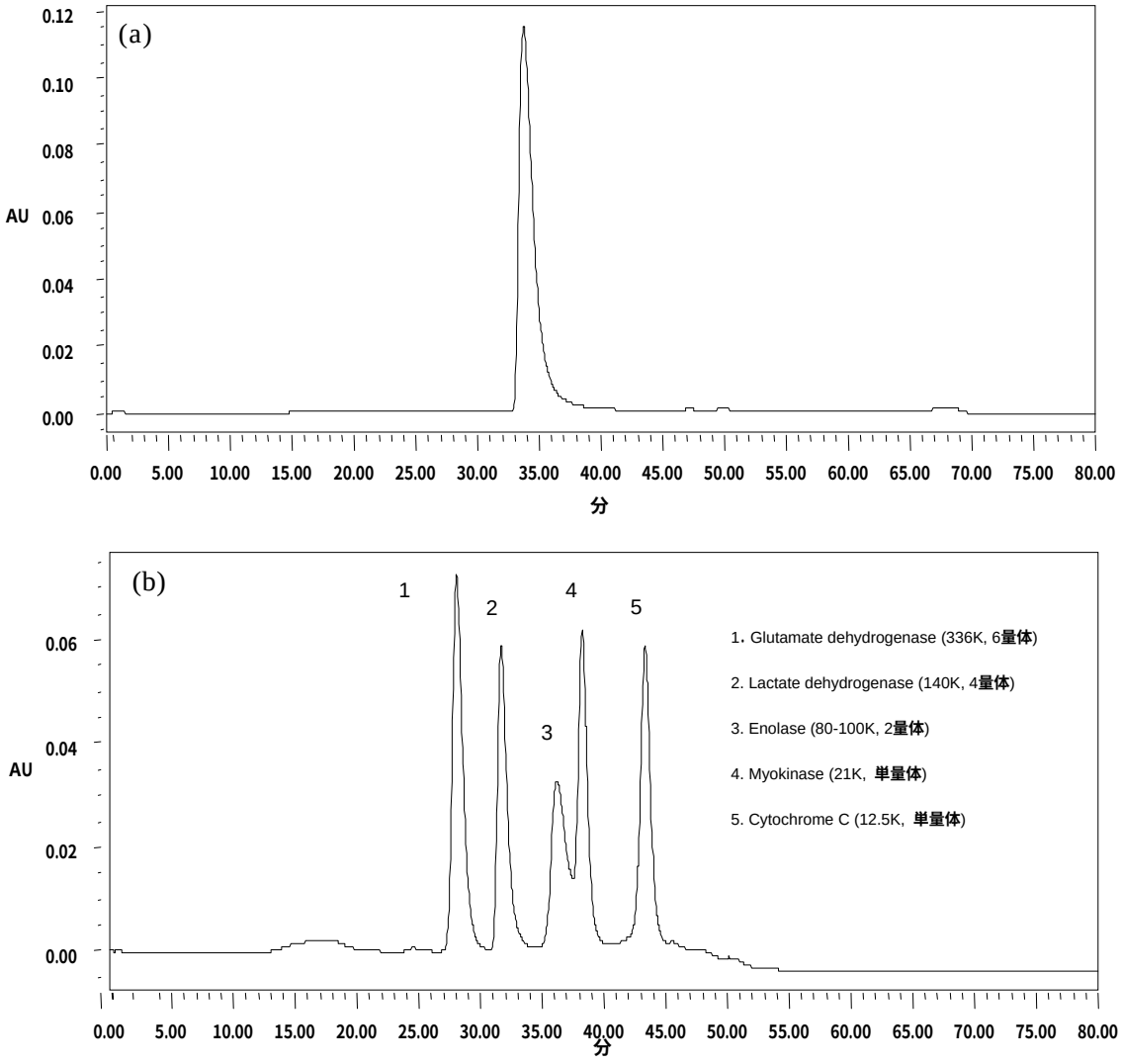
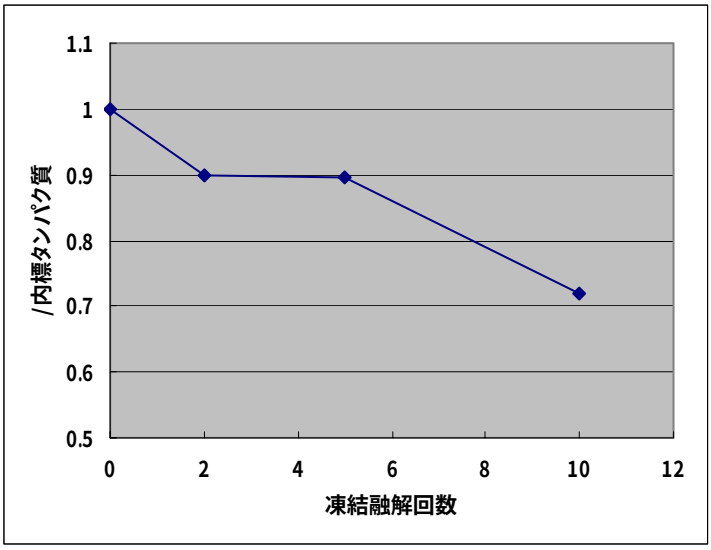


表 4　ゲルろ過 HPLC の繰り返し再現性

注入量	ピーク面積 (RSD, %)	ピーク高さ (RSD, %)
5　μg	6.84	10.90
10　μg	0.60	2.41
20　μg	0.32	0.58

図4　ゲルろ過 HPLC を用いた凍結融解サンプルの安定性評価



（２）電気泳動法

電気泳動分析は、蛋白質試料を予め界面活性剤（SDS）で変性後、ポリアクリルアミドゲルなどの支持体の中で分離分析する方法である。この方法においては、変性条件下で目的蛋白質および目的外蛋白質の分子量の推定および相対的存在割合を調べることが出来る。今回は CRP の分離条件を確立後、凍結融解サンプルを用いた測定系の評価を行った。

１）実験方法

①　　分離条件の確立

CRP 溶液原液 10 μg 相当をトリクロロ酢酸沈殿処理とアセトン沈殿処理で脱塩後、20μl の 1× SDS 化バッファー（31.5 mM Tris-HCl (pH6.8)－ 50 % グリセロール－25 ％　メルカプトエタノール－10 ％　SDS）を加え、37 ℃に 5 分間保温して SDS 化サンプルとした。Laemmli [5] の方法で作製した SDS-15 %ポリアクリルアミドゲル（約 9 ｃｍ×7 ｃｍ、18 ウェル）で上記サンプル 10 μl/ レーンを電気泳動後、クマシー染色した。クマシー染色においては、電気泳動後のゲルを染色液（0.2 % Coomassie Brilliant Blue- R250 (CBB), 50 % メタノール、10 ％　酢酸）に 30 分間浸して振とうし、染色液を捨て脱色液（25 %メタノール、7 %酢酸）でバンドが現れるまで脱色した。脱色後のゲルは Chemi-Doc（Bio-Rad）によって写真撮影および解析を行った。

②凍結融解サンプルを用いた測定系の評価

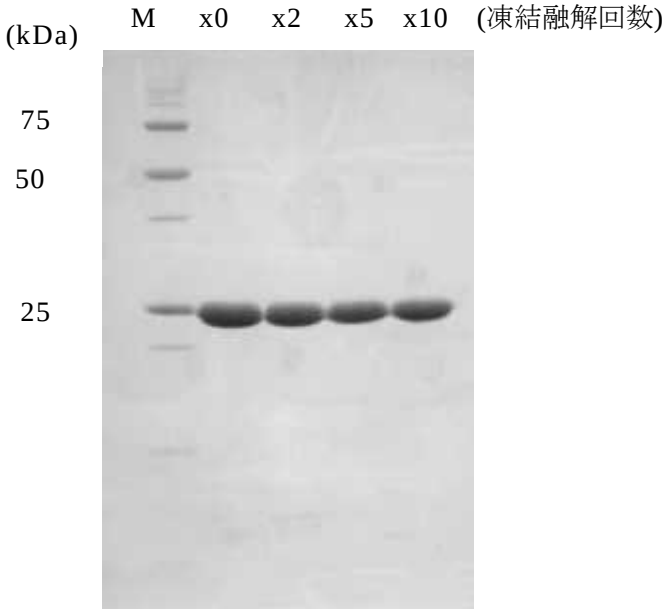
凍結融解サンプルを用いて、本測定系がサンプル中の分解産物を検出するのに使用できるかどうかの評価を行った。凍結融解サンプルの調製方法は４.（１） 1） ③と同様。

２）結果および考察

電気泳動の結果、CRP 由来のバンドは推定分子量約 25 kDa を示し、これまでに報告されている CRP サブユニットの理論的分子量と一致した。また、凍結融解サンプル間でバンドパターンを比較した結果、凍結融解回数に関わらず、分解産物由来のバンドは見られなかった（図５）

上記の結果より、本測定系によって候補標準物質（CRP）の安定性を評価するのは難しいと結論付けた。

図 5　電気泳動法による凍結融解サンプルの安定性評価



（3）アフィニティクロマトグラフィ

アフィニティクロマトグラフィは、抗原と抗体、酵素と基質など生物学的に親和性の高いもの同士の片方をクロマト管に詰めてもう片方を特異的に分離分析する方法である。この方法においては、試料中にカラム結合能を持つ分子（即ち蛋白質としての活性を保っている分子）がどの程度の割合で存在するかを評価する。今回は CRP 溶液の精製条件を確立後、再現性の検討、凍結融解サンプルを用いた測定系の評価を行った。

1）実験方法

① 精製条件の確立

天然型 CRP は Ca^{2+}存在下で 6-アミノカプロン酸と結合し、Ca^{2+}除去によって遊離する性質を有している。この性質を利用して、Tanaka T.[1)]らの方法を参考に以下のような精製を行った。1 mL の ECH-Sepharose(別名：epsilon-aminocaproic acid-agarose)（Amersham Bioscience)を空カラムに充填後、FPLC(LCC-500, Amersham Bioscience)に接続して、緩衝液 A（20 mM Tris-HCl－0.14 M NaCl－2 mM $CaCl_2$－0.1 % NaN_3）で平衡化した。CRP 溶液原液を注入後、再び緩衝液 A で洗浄し、緩衝液 B（20 mM Tris-HCl－0.14 M NaCl－5 mM EDTA－0.1 % NaN_3）で吸着成分を溶出した。溶出後のサンプルは FPLC に接続した UV 検出器(UV1, Amersham Bioscience)でピークを分取後（λ max = 280 nm）、得られた画分の秤量および吸光度測定（λ max = 280 nm）を行った。

② 再現性の検討

CRP 溶液原液を 0.5 mg 相当注入し、回収率（試料の注入量に対する相対的溶出試料量）を求めた。測定値に基づいた回収率は下記の式により求めた。同様の分析を 3 回連続で行い、繰り返し再現性の確認を行った。

回収率 ＝（A_{280}（溶出画分）× 秤量値（溶出画分））/ (A_{280}（注入画分）×秤量値（注入画分）)

③凍結融解サンプルを用いた測定系の評価

凍結融解サンプルを用いて、本測定系がサンプル中に含まれる活性 CRP 量を測るのに適しているかを評価した。凍結融解サンプルの調整方法は４.（１） 1）③と同様。

２）結果および考察

CRP 溶液原液を用いて n = 3 で測定を行ったときの回収率は、平均 1.04 で理論的な値にほぼ一致し、再現性も RSD(%) ≒ ３で良好であった（表５）。

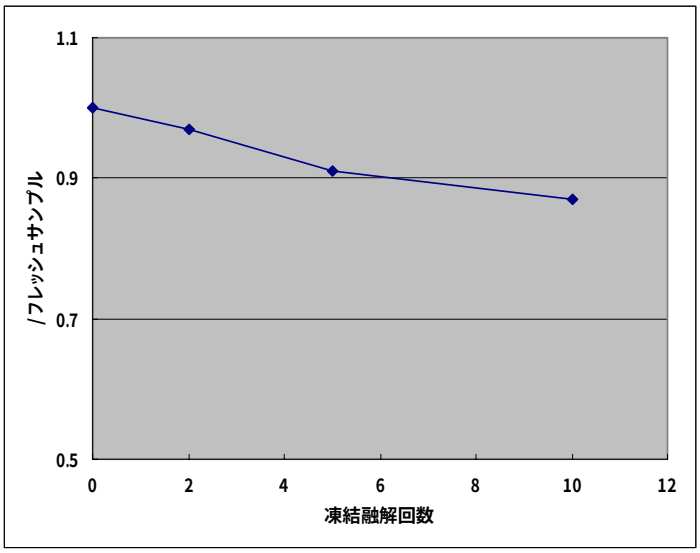
凍結融解サンプル中の活性 CRP の定量を行ったところ、凍結融解回数が増えるにつれて活性 CRP の量は漸次減少していく様子が見て取れた(図６)

上記の結果より、本測定系は候補標準物質（CRP）の免疫学的安定性を評価するのに十分な定量性を有しているものと結論付けた。

表 5 アフィニティークロマトグラフィーの繰り返し再現性

	回収率
1 回目	1.00
2 回目	1.07
3 回目	1.04
平均	1.04
RSD (%)	3.18

図6　アフィニティクロマトグラフィによる凍結融解サンプルの安定性評価



５．今後の課題

濃度決定法に関しては、アミノ酸分析法と窒素分析法の 2 つの測定系について基礎的検討を行い、各々の測定により得られた結果がほぼ一致することを確認できた。この傾向については、試料の種類を替えた場合にも確認された。しかし、両分析の結果は秤量ベースの濃度値や吸光度から得られた濃度値に比べて若干低い傾向にあり、その原因について究明しておく必要があると考えられる。(株) ペプチド研でアミノ酸分析に関する調査を行った際には蛋白試料中に含まれる水分や塩分が秤量値や吸光度に影響している可能性があるとのコメントがあったので、それらの影響について検討の必要があるかもしれない。また、アミノ酸分析に関しては、たとえば、換算に用いるアミノ酸などについてはさらに詳細に検討し、測定方法を最終的に決定していく必要がある。このような検討を踏まえて、最終的な値付け方法としての確立を行っていく。

安定性試験においては、当初計画していた 4 つの測定系のうち 3 つについて確立を終えることが出来た。今後は残りひとつの測定系についての検討を終了し、候補標準物質とする予定の CRP 溶液についての安定性試験を実施し、長期安定性を実際に解析していく。長期にわたる安定性試験においては、日間誤差をどのように補正するのかが問題になると思われるが、いくつかの内部標準を試すことで最適な方法が確立できると考えている。

参考文献

１）松尾　雄志、田中　俊夫：リコンビナント CRP の作製と蛋白化学、臨床検査 46(9)（2002）972-981.

２）Kimberly, M. , Vesper, S. W., Caudill, S. P., Cooper, G. R., Rifai, N., Dati, F., and Myers, G. L. Standardization of Immunoassays for Measurement of High-Sensitivity C-reactive Protein. Phase I: Evaluation of Secondary Reference Material, *Clin. Chem.*, 49(4) (2003) 611-616.

３）De Beer, F.C. and Pepys, M. B. Isolation of human C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Immunol Methods.* 50(1) (1982) 17-31.

４）Morimatsu, M. et. al. Isolation and characterization of C-reactive protein and serum amyloid P component from bovine serum. *Nippon Juigaku Zasshi.* 51(4) (1989) 723-732.

５）Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.*Nature.* 227 (1970) 680-685.

２－４　実試料系標準物質の調査研究

２－４－１　総　括

１．調査研究の進め方

多くの成果を挙げることも考慮したため平成１７年度報告項目に重要な関連項目を加え項目群ワーキンググループ（WG）として活動した。（参照：調査項目群WG一覧表）

WGは、参画各社の技術担当者、JCCLSから推薦された臨床担当アドバイザー・技術担当アドバイザー、運営管理者（（社）日本臨床検査薬協会（臨薬協）の技術運営委員）から構成される。運営は、責任者（各WGから選出）が行い運営管理者は全体的な進捗管理を行う。運営管理者は、個々のWG報告を柱１担当が参加する臨薬協の技術運営委員会で報告し、基本検討委員会の柱1委員会との調整を図っている。

WGは、多くの各社が参加し短期間に的確な調査及び確実な検証実験を共同で実施する必要がある。このため基本検討委員会は、具体的な検討内容を記載した「実行計画書（暫定）」を作成し項目群WGに案内した。

＊実行計画書の考え方＊

①各項目を基準１・基準２で調査し分類する。
　基準１：公的標準物質（NIST・WHOなど）の調査
　基準２：純物質・精製物質の入手の可・否の調査

⇩

［標準物質候補品が作製可能な場合］

⇩

②標準物質候補品を作製
③標準物質候補品の評価
　実試料（患者血清・患者尿　など）を用い反応性の確認を行う。

WGは「実行計画書（暫定）」を基に調査研究を行い、標準物質候補品が作製可能な項目は、実行計画書を作成し共同実験を行った。

平成17年度の調査研究項目に該当するWGは、C1（尿中電解質成分・尿中生化学成分・血清無機リン）[注1]、C2（血清リチウム）、C3（血清抗核抗体）、C9（血清前立腺特異抗原（PSA））である。このため該当するWGからの報告とする。また、血清総ビリルビンも検討したので報告する。

注１：尿中ナトリウム（Na）、尿中カリウム（K）、尿中クロール（Cl）を尿中電解質成分とした。また、尿中マグネシウム（Mg）、尿中カルシウム（Ca）、尿中尿素窒素（UN）、尿中尿酸（UA）、尿中クレアチニン（Cre）、尿中アミラーゼ（AMY）、尿中グルコース（Glu）、尿中無機リン（IP）を尿中生化学成分とした。

２．結果のまとめ

本調査研究により、尿中電解質成分・尿中生化学成分・血清無機リン・血清前立腺特異抗原（PSA）・血清リチウム（Li）・血清総ビリルビンの各項目に関しては標準物質候補品の作製が可能であると判断した。そこで、さらに標準物質候補品を作製し共同実験を行った。このうち PSA を除く候補品を用いた校正による測定値の収束性は、血清標準物質及び各社キャリブレーターと同等の結果を示した。これにより実用標準物質の作製が可能と判断し、平成 18 年度は、実試料標準物質の作製作業に取り組むこととなった。

なお、PSA は、血清ベースの候補品と緩衝液ベースの候補品を作製し、それぞれによる校正効果を比較したが、血清・緩衝液のベースによる有意差は見られず、また、血清ベース標準物質の作製には、安定な処理等が必要であった。しがって、現時点では緩衝液ベースの標準物質でも十分な有効性があると考えられた。

一方、血清抗核抗体は、本調査研究により間接蛍光抗体法において標準物質を用いることで標準化の効果が予想できたことから、平成 18 年度に検証実験を行う予定である。

３．今後の課題

尿中電解質成分・尿中生化学成分・血清無機リンは、標準物質の濃度設定の検討が必要である。また、標準物質の候補品を用いた校正による測定値の収束性は、日常検査法の測定原理により異なったため、標準物質のマトリックスの検討が必要である。ただし、尿中生化学成分のうちアミラーゼは、標準物質中のアイソエンザイムの存在比率の検討が必要である。

PSA は、今後、血清ベースの安定な処理法を改良できれば、マトリックスの問題を解消できる血清ベースの標準物質を作製できると考える。

血清抗核抗体は、ISO ガイドに沿った標準物質の作製と基準測定操作法の設定が引き続いて検討されるが、他の測定項目と異なり、臨床診断上での使い方を特化した標準化を考慮する必要がある。すなわち診断値付近での測定値の互換性の確保に焦点を合せる。

血清リチウム（Li）は、各社の測定範囲を考慮して標準物質の設定濃度を決める必要がある。また、添加検体でなく実検体を用いた検証試験の方法も検討する必要がある。

血清総ビリルビンは、再検証を行った後に作製プロトコルの作業及び基準測定操作法の設定を行う。

［調査研究項目群ワーキンググループ一覧表］

WG 名	項目
C1	尿用標準物質　Na/K/Cl/Mg/Ca/UN/UA/Cre/AMY/Glu/IP、血清無機リン
C2	血清リチウム（Li)、血清総ビリルビン
C3	血清抗核抗体、RF
C4	ジゴキシン、テオフィリン
C5	黄体形成ﾎﾙﾓﾝ、卵胞刺激ﾎﾙﾓﾝ、ｴｽﾄﾗｼﾞｵｰﾙ、ﾌﾟﾛｹﾞｽﾃﾛﾝ、ﾃｽﾄｽﾃﾛﾝ、ﾌﾟﾛﾗｸﾁﾝ
C6	TSH、T3、FT３、T4、FT4、サイログロブリン
C7	ヒト絨毛性ゴナドトロピン
C8	FDP、D ダイマー
C9	CEA、AFP、CA125、CA15-3、CA19-9、PSA、ﾌｪﾘﾁﾝ、β２ーﾏｲｸﾛｸﾞﾛﾌﾞﾘﾝ

２－４－２　各　論

２－４－２－１　尿中電解質成分

要旨

１）尿中電解質成分について、「実試料標準物質候補品を調製・使用し、市販キットのデータ収束性について検証を行う」ことを目的とした調査研究を実施した。

２）測定項目は日常検査で汎用されている項目：ナトリウム、カリウム、クロールとした。

３）尿中電解質成分に関して調査した結果本邦にて入手可能な尿実試料標準物質は存在せず、各企業は NIST、JCSS 等の高純度標準物質を直近上位標準としたトレーサビリティ体系となっていることがわかった。

４）本年度は市販キットの互換性の調査及び実試料標準物質を使用した予備試験で収束性について検討した。方法は各社の測定のプロトコルに従い患者尿 32 例を測定した。その際、血清用実試料標準物質、尿用実試料標準物質候補品も検体として測定し収束性を確認した。
解析方法は各キット間の収束性を CV により検証した。また、反応性評価は、市販キャリブレーターにより較正した各社装置で各標準品を測定し、その測定値の変動係数として評価した。さらに、トレーサビリティ体系の上位測定法による測定値と各社装置による測定値との相関係数の傾きの変動係数から各標準候補品による収束性を評価した。

５）その結果、現行の状態で試薬間測定値の互換性は得られており、本実験で使用した標準候補品は血清標準品及び各社キャリブレーターと同等の収束性を示した。

６）今後の課題としては標準物質の濃度設定の検討が必要であり、また、測定原理により収束性が異なったため、標準物質候補品のマトリックスの検討が必要と思われる
なお、平成 18 年度は残る課題を解決して、実試料標準物質の作製作業を予定している。

１．目　的

本調査研究項目群、C1（尿中電解質成分、尿中生化学成分、血清無機リン）内の尿中電解質成分について、「尿中電解質成分の実試料標準物質候補品を調製・使用し、各社装置のデータの収束性について検証を行う」ことが本調査研究の目的である。

なお、今回の尿中電解質成分に該当する項目は Na、K、Cl とした。

２．委員会の構成

	氏名	所属
責任者	小林　隆	栄研化学株式会社
運営管理者（臨薬協）	小林　隆	栄研化学株式会社
柱 1／C1 担当	中野　頼人	株式会社シノテスト
実行計画作成者	山崎 浩樹	株式会社テクノメディカ
技術アドバイザー	桑　克彦	筑波大学大学院　助教授
技術アドバイザー	森下　芳孝	三重大学病院中央検査部技師長
技術担当者	山下 章吾	アークレイマーケティング株式会社
技術担当者	榊　徹	株式会社エイアンドティー
技術担当者	樋渡 亮二	ｵｰｿ･ｸﾘﾆｶﾙ･ﾀﾞｲｱｸﾞﾉｽﾃｨｯｸｽ株式会社
技術担当者	渡邊 郁子	株式会社常光
技術担当者	斉藤 憲祐	デイド・ベーリング株式会社
技術担当者	山崎 浩樹	株式会社テクノメディカ
技術担当者	横田 敦子	ベックマン・コールター株式会社
技術担当者	吉海　毅	ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
技術担当者	三浦　弘一	オリンパス株式会社
技術担当者	保田　　健二	株式会社日立ハイテクノロジーズ
技術担当者	原田　孝	東芝メディカルシステムズ株式会社
技術担当者	柏木泰敏	日本電子株式会社

３．委員会の開催

① 第一回会合：2005/11/21（月）13：00～15：00　（臨薬協会議室）

② 第二回会合：2006/4/12（水）10：00～12：00　（臨薬協会議室）

４．調査研究の概要

（１）測定値の互換性の現状

１）現状の調査

①市販されている標準物質

日本における尿中電解質成分の実試料標準物質は存在しないことが確認できた。

②尿測定の実態調査

参加企業にアンケート調査を実施した結果、尿中電解質成分に関しては血清測定用のキャリブレーターを使用しているメーカーが殆どであるが、尿測定用のキャリブレーターを使用しているメーカーが一社あり、その測定の多くは NIST 等の純物質系標準物質、HECTEF SRC より頒布されている実試料標準物質を直近上位標準とした trac トレーサビリティ体系となっていることがわかった。

２）現状把握のための実験

尿中電解質成分における試薬間測定値の互換性に関するデータは無いため、各社装置の互換性の調査及び実試料標準物質を使用した収束性の予備試験を以下の通り実施した。

① 市販キャリブレーターによる収束性の現状

② HECTEF SRC 製造の血清標準品（CA-6）による収束性の効果
CA-6（Na、K、Cl）

③ HECTEF SRC 製造の人工尿標準候補品、人尿標準候補品による収束性の効果

方法は各社尿測定のプロトコルに従い患者尿 32 例を測定した。その際、上記②・③に関しても検体として測定し収束性を確認した（以下、②・③を標準品と総称する）。

３）実験結果

市販キャリブレーターによる収束性として、各社装置による患者尿の測定結果の変動係数(CV 値)を算出し、患者尿 32 例それぞれの変動係数の変動係数(CV 値)を算出することで評価した。そして、血清標準品(CA-6)、人工尿標準候補品および人尿標準候補品各 2 濃度により検量補正して各社装置で患者尿 32 例を測定し、同様に変動係数としてその収束性を評価し、市販キャリブレーターによる収束性と比較した。また、反応性評価は、市販キャリブレーターにより較正した各社装置で各標準品を測定し、その測定値の変動係数として評価した。さらに、トレーサビリティ体系の上位測定法による測定値と各社装置による測定値との相関係数の傾きの変動係数から各標準候補品による収束性を評価した。

なお、Na、K、Cl 測定はサンプルを専用の希釈液で希釈して測定する希釈測定法(間接測定法)、サンプルを希釈することなしに直接測定する直接測定法およびドライ試薬により測定するドライケミストリー法があり、希釈測定法は 9 社 10 機種、直接測定法は 2 社 2 機種、ドライケミストリー法は 2 社 2 機種が参加、調査を行った。希釈測定法、直接測定法およびドライケミストリー法それぞれの反応性が異なるために必要に応じて測定法毎の集計を行い、比較、考察した。ただし、直接測定法とドライケミストリー法は測定法毎の集計には該当機種が少ないために全て直接測定法に含めて比較、考察した。そのために、直接測定法の評価結果には測定法間の異なるデータを含んだ結果が示されている。

① 尿中ナトリウム（Na）

12 社 14 機種での市販キャリブレーターによる収束性は CV4.0～13.0％(平均値 7.3%)に対して標準血清(CA-6)による収束性は CV2.9～14.0％(平均値 7.0%) 、人工尿標準候補品による収束性は CV4.2～14.3％(平均値 9.1%)、人尿標準候補品による収束性は CV4.1～14.4％(平均値 9.1%)であり、各標準候補品はいずれも血清標準品と同等の収束性が得られた（Table 1-1）。

希釈法のみの装置で同様に評価した場合にも市販キャリブレーターによる収束性は CV2.0～15.6％(平均値 6.4%)に対して標準血清(CA-6)による収束性は CV1.1～15.8％(平均値 6.3%) 、人工尿標準候補品による収束性は CV0.9～14.1％(平均値 5.3%)、人尿標準候補品による収束性は CV1.1～13.8％(平均値 5.5%)であり、各標準候補品はいずれも血

清標準品と同等の収束性が得られた（Table 1-1）。直接法のみの装置でも同様に市販キャリブレーターによる収束性は CV1.1～23.8%(平均値 7.3%)に対して標準血清(CA-6)による収束性は CV2.1～23.0%(平均値 8.5%) 、人工尿標準候補品による収束性は CV9.2～30.2%(平均値 17.6%)、人尿標準候補品による収束性は CV8.4～32.9%(平均値 17.8%)であり、各標準候補品はいずれも血清標準品と同等の収束性が得られた（Table 1-1）。

12 社 14 機種での反応性評価として、市販キャリブレーターに基づく各社装置による各標準品の測定値の変動係数は、標準血清(CA-6)の M が CV4.54%、標準血清（CA-6）の L が CV4.53%に対して人工尿標準候補品 Level1 が CV6.61%、人工尿標準候補品 Level2 が CV6.43%、人尿標準候補品 Level1 が CV5.66%、人尿標準候補品 Level2 が CV5.05%となり、各標準候補品はいずれも血清標準品と同等の収束性が得られた（Table 1-2）。

さらに、12 社 14 機種でのトレーサビリティ体系の上位測定法による測定値と各社装置による測定値との相関係数の傾きの変動係数は、市販キャリブレーターが CV9.91%、標準血清(CA-6)が CV11.58%、人工尿標準候補品が CV12.87%、人尿標準候補品が CV9.61%で、各標準候補品はいずれも血清標準品と同等の収束性が得られた（Table 1-3）。

② 尿中カリウム（K）

12 社 14 機種での市販キャリブレーターによる収束性は CV4.3～16.3%(平均値 8.5%)に対して標準血清(CA-6)による収束性は CV14.2～25.4%(平均値 18.3%) 、人工尿標準候補品による収束性は CV7.4～18.8%(平均値 11.6%)、人尿標準候補品による収束性は CV4.8～17.3%(平均値 9.7%)であり、各標準候補品はいずれも血清標準品と同等の収束性が得られた（Table 1-1）。

希釈法のみの装置で同様に評価した場合にも市販キャリブレーターによる収束性は CV3.1～19.1%(平均値 7.7%)に対して標準血清(CA-6)による収束性は CV1.4～18.0%(平均値 6.7%) 、人工尿標準候補品による収束性は CV0.9～18.5%(平均値 6.1%)、人尿標準候補品による収束性は CV0.9～18.7%(平均値 6.1%)であり、各標準候補品はいずれも血清標準品と同等の収束性が得られた（Table 1-1）。直接法のみの装置でも同様に市販キャリブレーターによる収束性は CV1.9～29.7%(平均値 10.5%)に対して標準血清(CA-6)による収束性は CV18.1～45.3%(平均値 30.4%) 、人工尿標準候補品による収束性は CV10.7～40.0%(平均値 22.3%)、人尿標準候補品による収束性は CV4.5～35.2%(平均値 16.1%)であり、各標準候補品はいずれも血清標準品と同等の収束性が得られた（Table 1-1）。

12 社 14 機種での反応性評価として、市販キャリブレーターに基づく各社装置による各標準品の測定値の変動係数は、標準血清(CA-6)の M が CV29.04%、標準血清（CA-6）の L が CV25.28%に対して人工尿標準候補品 Level1 が CV30.57%、人工尿標準候補品 Level2 が CV10.89%、人尿標準候補品 Level1 が CV30.02%、人尿標準候補品 Level2 が CV7.41%となり、各標準候補品はいずれも血清標準品と同等の収束性が得られた（Table 1-2）。

さらに、12 社 14 機種でのトレーサビリティ体系の上位測定法による測定値と各社装置による測定値との相関係数の傾きの変動係数は、市販キャリブレーターが CV12.24%、

標準血清(CA-6)が CV23.89％、人工尿標準候補品が CV15.31％、人尿標準候補品が CV12.42％で、各標準候補品はいずれも血清標準品と同等の収束性が得られた（Table 1-3）。

③ 尿中クロール（Cl）

12 社 14 機種での市販キャリブレーターによる収束性は CV3.5～18.2％(平均値 8.7%)に対して標準血清(CA-6)による収束性は CV3.2～16.5％(平均値 8.2%) 、人工尿標準候補品による収束性は CV5.1～18.5％(平均値 9.4%)、人尿標準候補品による収束性は CV5.1～19.1％(平均値 9.2%)であり、各標準候補品はいずれも血清標準品と同等の収束性が得られた（Table 1-1）。

希釈法のみの装置で同様に評価した場合にも市販キャリブレーターによる収束性は CV3.5～20.6％(平均値 7.9%)に対して標準血清(CA-6)による収束性は CV2.0～18.7％(平均値 7.1%) 、人工尿標準候補品による収束性は CV3.1～17.7％(平均値 7.3%)、人尿標準候補品による収束性は CV3.2～19.1％(平均値 7.7%)であり、各標準候補品はいずれも血清標準品と同等の収束性が得られた（Table 1-1）。直接法のみの装置でも同様に市販キャリブレーターによる収束性は CV1.2～27.6％(平均値 8.6%)に対して標準血清(CA-6)による収束性は CV2.9～30.9％(平均値 10.9%) 、人工尿標準候補品による収束性は CV5.2～21.1％(平均値 12.2%)、人尿標準候補品による収束性は CV5.4～21.4％(平均値 12.1%)であり、各標準候補品はいずれも血清標準品と同等の収束性が得られた（Table 1-1）。

12 社 14 機種での反応性評価として、市販キャリブレーターに基づく各社装置による各標準品の測定値の変動係数は、標準血清(CA-6)の M が CV3.10％、標準血清（CA-6）の L が CV3.38％に対して人工尿標準候補品 Level1 が CV8.32％､人工尿標準候補品 Level2 が CV7.13％､人尿標準候補品 Level1 が CV8.34％､人尿標準候補品 Level2 が CV5.81％となり、各標準候補品はいずれも血清標準品と同等の収束性が得られた（Table1-2）。

さらに、12 社 14 機種でのトレーサビリティ体系の上位測定法による測定値と各社装置による測定値との相関係数の傾きの変動係数は、市販キャリブレーターが CV11.44％、標準血清(CA-6)が CV9.48％、人工尿標準候補品が CV10.44％、人尿標準候補品が CV10.73％で、各標準候補品はいずれも血清標準品と同等の収束性が得られた（Table 1-3）。

４）考察

尿中電解質成分における各社装置間の測定値の互換性に関するデータを取得した。各社装置による市販のキャリブレーターに基づく患者尿の収束性は一定水準に達しているのが現状である。これは、既に血清用の標準物質が実用化されており、その物質を用いた測定値の標準化が行われている現状を考えると至極当然のことと考えられる。市販のキャリブレーターに基づく患者尿の収束性と標準血清に基づき較正した各社装置による患者尿の測定結果の収束性に差異のないことは、その考察を裏付けていると考えられる。尿標準候補品による収束性向上の確認においても標準血清と同等の収束性を示した。

標準血清に基づく校正による各社装置での測定値の収束性は尿標準候補品に基づく較正による

各社装置での測定値の収束性と差異はなかった。この結果は、反応性評価結果および相関評価結果からも同様な結論を導くことができる。

以上の結果から、既に確立して実用化されている標準血清に基づく正確性の評価と同等の収束性、反応性を有する尿標準物質候補品は尿測定における正確性確保を目的とした標準物質として実用性を有していると結論できる。しかし、今回の調査を通して、尿標準物質の設定にはいくつかの課題のあることも明確にできた。

電解質測定は調査に参加の全装置でイオン選択性電極が採用されている。イオン選択性電極法として同一の測定原理でも測定方式を種々取り得ることができ、希釈測定法、直接測定法、ドライケミストリー法に大別できる。また、それぞれの電極(各社の電極)で特有の選択性を有しており、使用における経時的な状況によってもそれは変化する。それぞれの測定方式で優劣があり、実験結果でもそれらの測定方式差が如実に現れている。標準血清、尿標準候補品で測定結果の収束性の改善は確認できなかったが、イオン選択性電極法の特徴を考慮した検討を課題とする必要がある。

現状の収束性を示す要因には次の点が考えられる。

① 各社装置の測定原理に基づく差
② 各社装置の測定方式に依存する差
③ 標準物質候補品の設定濃度値
④ 標準物質候補品のマトリックス
⑤ 評価用患者尿の濃度域

ここで、各社装置の測定原理に基づく差および測定方式に依存する差は、各社の商品コンセプトに由来するために、改善することはできない。一方、標準物質候補品の設定濃度値およびマトリックスは本検討の主題と捉えることができる。今回の検討では設定濃度値として標準血清との比較を考慮して設定した。反応性は標準血清と尿標準候補品と差異がなかった。したがって、次回の尿標準物質候補品の作製に際しては、患者尿の全濃度域内の適正な濃度を設定する必要がある。またマトリックスは、pH 変化の小さい組成、分解して重炭酸や炭酸ガスあるいはアンモニアを発する物質が少ないことに配慮するとともに、タンパク質や脂質成分濃度および共存塩濃度、保存剤、安定剤による影響に対する各社装置の測定値への影響を検討する必要がある。さらに、評価するに当って患者尿の濃度域の設定について、実際に患者尿として存在する広い範囲でのサンプルを使用して評価する必要がある。

（2）標準化および標準物質の設定経過

（1）の結果に基づき、人工尿標準候補品により各社のキャリブレーターと同等の収束効果を確認した為、人工尿標準候補品を標準物質にすべく次のステップへ進むこととした。

（3）標準物質の設定

人工尿標準候補品をベースとして今後設定する。

（4）値付けの測定方法の選択

今回の標準候補品の値付けの方法は HECTEF SRC に一任した。HECTEF SRC が行なった方

法は以下の通りである。

項目	較正物質	測定方法
u-Na	SRM 919a (NaCl)	フレーム光度法
u-K	SRM 918a (KCl)	フレーム光度法
u-Cl	SRM 919a (NaCl)	電量滴定法

５．標準物質の作製プロトコル

（１）トレーサビリティシステム

SI 単位系を最上位に位置づける体系とした。

（２）性状規格

今後設定する。

（３）基準測定操作法（RMP 可能な場合）又は共同実験

（４）の測定法の検証を含めて今後設定する。

（５）値付けの手順

今後設定する。

（６）認証値と不確かさ（共同実験の場合は ISO ガイド 35 に従う。その他 GUM による）

今後設定する。

６．今後の課題

平成 18 年度は、これまでの結果を基に実試料標準物質候補品作製のための本格的な作業を行う。主な作業としてはマトリックス、設定濃度、設定本数の検討であり、実試料標準物質候補品での収束性及び反応性の再検証の確認をした後に作製作業を行う。

７．結び

平成 17 年度の研究において、尿中電解質成分（Na、K、Cl）の実試料標準物質候補品の作成を行い、かつ予備検証試験も行い、その有用性について確認した。平成 18 年度は残る課題を解決して、実試料標準物質の作製作業を予定している。

Table1-1 収束性データ

ナトリウム(Na)

C.V.%

	全メーカー間差			メーカー(希釈法)間差			希釈法以外のメーカー間差		
	最小値	最大値	平均	最小値	最大値	平均	最小値	最大値	平均
市販キャリブレーター	4.0	13.0	7.3	2.0	15.6	6.4	1.1	23.8	7.3
標準血清CA-6	2.9	14.0	7.0	1.1	15.8	6.3	2.1	23.0	8.5
人工尿標準候補品	4.2	14.3	9.1	0.9	14.1	5.3	9.2	30.2	17.6
ヒト尿標準候補品	4.1	14.4	9.1	1.1	13.8	5.5	8.4	32.9	17.8

カリウム(K)

C.V.%

	全メーカー間差			メーカー(希釈法)間差			希釈法以外のメーカー間差		
	最小値	最大値	平均	最小値	最大値	平均	最小値	最大値	平均
市販キャリブレーター	4.3	16.3	8.5	3.1	19.1	7.7	1.9	29.7	10.5
標準血清CA-6	14.2	25.4	18.3	1.4	18.0	6.7	18.1	45.3	30.4
人工尿標準候補品	7.4	18.8	11.6	0.9	18.5	6.1	10.7	40.0	22.3
ヒト尿標準候補品	4.8	17.3	9.7	0.9	18.7	6.1	4.5	35.2	16.1

クロール(Cl)

C.V.%

	全メーカー間差			メーカー(希釈法)間差			希釈法以外のメーカー間差		
	最小値	最大値	平均	最小値	最大値	平均	最小値	最大値	平均
市販キャリブレーター	3.5	18.2	8.7	3.5	20.6	7.9	1.2	27.6	8.6
標準血清CA-6	3.2	16.5	8.2	2.0	18.7	7.1	2.9	30.9	10.9
人工尿標準候補品	5.1	18.5	9.4	3.1	17.7	7.3	5.2	21.1	12.2
ヒト尿標準候補品	5.1	19.1	9.2	3.2	19.1	7.7	5.4	21.4	12.1

Table1-2 反応性データ

ナトリウム(Na)

Sample No.	メーカー名		表示値	J-1	J-2	B	K	G	H	I	E	L	D-1	D-2	F	A	C	最小値	最大値	平均	標準偏差	C.V.%
1	標準血清CA-6	M	140.9	141.0	140.7	141.2	140.5	137.2	144.8	141.8	132.3	139.2	142.0	160.3	141.2	139.7	150.0	132.33	160.33	142.28	6.47	4.54
2	標準血清CA-6	H	155.7	155.7	155.3	155.9	155.0	154.0	160.2	156.8	147.7	153.6	157.0	178.3	154.5	154.0	165.0	147.67	178.33	157.35	7.12	4.53
11	電解質人工尿標準候補品	Level1	140	139.7	139.0	137.5	138.6	144.0	142.8	140.3	134.3	136.8	140.0	152.3	124.7	165.0	150.0	124.67	165.00	141.79	9.38	6.61
12	電解質人工尿標準候補品	Level2	200	202.0	199.7	195.1	200.7	210.0	209.0	204.1	194.7	199.6	202.3	225.7	204.3	244.0	216.7	194.67	244.00	207.71	13.36	6.43
13	電解質尿標準候補品	Level1	139	139.3	138.0	138.3	136.8	142.3	141.4	139.5	134.0	136.0	139.0	150.7	123.7	158.3	145.0	123.67	158.33	140.17	7.94	5.66
14	電解質尿標準候補品	Level2	194	195.0	193.7	200.7	194.7	203.7	202.1	196.7	188.3	193.8	197.0	219.7	195.0	222.3	211.7	188.33	222.33	201.03	10.14	5.05

カリウム(K)

Sample No.	メーカー名		表示値	J-1	J-2	B	K	G	H	I	E	L	D-1	D-2	F	A	C	最小値	最大値	平均	標準偏差	C.V.%
1	標準血清CA-6	M	4.57	4.60	4.60	4.74	4.54	4.50	4.71	4.73	4.37	4.56	4.67	0.00	5.03	4.40	4.50	0.00	5.03	4.28	1.24	29.04
2	標準血清CA-6	H	5.65	5.70	5.63	5.87	5.63	5.60	5.82	5.84	5.40	5.70	5.80	0.70	6.13	5.40	5.50	0.70	6.13	5.34	1.35	25.28
11	電解質人工尿標準候補品	Level1	4	4.00	4.00	5.41	4.18	4.10	4.09	4.15	3.87	4.02	4.03	0.00	4.00	4.73	4.00	0.00	5.41	3.90	1.19	30.57
12	電解質人工尿標準候補品	Level2	20	20.07	19.63	21.16	20.18	21.03	20.71	20.59	19.20	20.74	20.20	17.60	22.47	27.73	22.00	17.60	27.73	20.95	2.28	10.89
13	電解質尿標準候補品	Level1	5.2	5.37	5.30	4.11	5.48	5.60	5.46	5.47	5.13	5.27	5.30	0.00	5.37	6.13	5.50	0.00	6.13	4.96	1.49	30.02
14	電解質尿標準候補品	Level2	20.6	20.87	20.40	20.47	20.98	22.00	21.50	21.21	19.80	21.38	20.93	18.57	22.40	25.50	22.50	18.57	25.50	21.32	1.58	7.41

クロール(Cl)

Sample No.	メーカー名		表示値	J-1	J-2	B	K	G	H	I	E	L	D-1	D-2	F	A	C	最小値	最大値	平均	標準偏差	C.V.%
1	標準血清CA-6	M	104.9	103.0	102.7	108.8	105.3	103.3	105.0	108.2	106.0	105.5	107.7	103.7	96.0	104.0	-	96.00	108.80	104.54	3.24	3.10
2	標準血清CA-6	H	119.5	118.7	118.3	123.6	120.2	117.3	121.2	123.9	121.3	120.3	125.0	119.3	108.8	118.3	-	108.77	125.00	119.72	4.05	3.38
11	電解質人工尿標準候補品	Level1	100	92.3	91.7	98.6	98.7	103.0	94.9	100.6	105.0	96.9	99.0	92.7	84.0	76.0	-	76.00	105.00	94.87	7.89	8.32
12	電解質人工尿標準候補品	Level2	200	202.3	201.7	197.3	201.3	208.0	210.1	204.6	195.7	194.1	199.0	196.3	174.0	159.7	-	159.67	210.10	195.69	13.95	7.13
13	電解質尿標準候補品	Level1	98	91.0	92.0	100.1	96.7	101.3	92.7	99.4	108.7	96.0	98.3	95.0	85.7	76.3	-	76.33	108.67	94.86	7.92	8.34
14	電解質尿標準候補品	Level2	199	200.0	201.3	196.6	198.6	204.3	207.6	202.8	195.3	193.9	200.7	200.0	176.3	167.3	-	167.33	207.63	195.76	11.38	5.81

Table1-3 相関性(傾き)データ

ナトリウム(Na)

メーカー名	J-1	J-2	B	K	G	H	I	E	L	D-1	D-2	F	A	C	最小値	最大値	平均	標準偏差	C.V.%
市販キャリブレータ	0.8444	0.8466	0.9586	0.9738	0.7886	1.0153	0.7230	0.8689	0.9204	0.9160	1.0318	0.9397	0.8311	0.9834	0.72	1.03	0.90	0.09	9.91
標準血清CA-6	0.8521	0.8543	0.9673	0.9962	0.6919	0.9778	0.7149	0.8387	0.9438	0.9038	0.8404	1.0456	0.8531	0.9703	0.69	1.05	0.89	0.10	11.58
電解質人工尿標準候補品	0.8128	0.8373	0.9980	0.9414	0.7169	0.9211	0.6796	0.8641	0.8784	0.8784	0.8442	0.7077	0.6321	0.8851	0.63	1.00	0.83	0.11	12.87
電解質尿標準候補品	0.8343	0.8364	0.8454	0.9250	0.7071	0.9194	0.6952	0.8796	0.8763	0.8763	0.8225	0.7245	0.7142	0.8113	0.70	0.93	0.82	0.08	9.61
平均値	0.8359	0.8437	0.9423	0.9591	0.7261	0.9584	0.7032	0.8628	0.9047	0.8936	0.8847	0.8544	0.7576	0.9125					

カリウム(K)

メーカー名	J-1	J-2	B	K	G	H	I	E	L	D-1	D-2	F	A	C	最小値	最大値	平均	標準偏差	C.V.%
市販キャリブレータ	0.7138	0.6718	0.9087	0.9253	0.9817	0.8760	0.8620	0.7807	0.8993	0.8943	1.0262	0.8871	0.6961	0.8516	0.67	1.03	0.86	0.10	12.24
標準血清CA-6	0.7009	0.7021	0.8710	0.9168	0.9638	0.8549	0.8387	0.8160	0.8520	0.8522	1.5833	0.8710	0.7517	0.9197	0.70	1.58	0.89	0.21	23.89
電解質人工尿標準候補品	0.7109	0.6875	0.9227	0.9253	0.9276	0.8432	0.8385	0.8147	0.8606	0.8851	0.9329	0.7686	0.4842	0.7570	0.48	0.93	0.81	0.12	15.31
電解質尿標準候補品	0.7092	0.6851	0.8553	0.9191	0.9218	0.8411	0.8435	0.8198	0.8598	0.8810	0.8512	0.8021	0.5535	0.7714	0.55	0.92	0.81	0.10	12.42
平均値	0.7087	0.6866	0.8894	0.9216	0.9487	0.8538	0.8457	0.8078	0.8679	0.8782	1.0984	0.8322	0.6214	0.8249					

クロール(Cl)

メーカー名	J-1	J-2	B	K	G	H	I	E	L	D-1	D-2	F	A	C	最小値	最大値	平均	標準偏差	C.V.%
市販キャリブレータ	0.8497	0.8589	0.9147	0.8965	0.6902	1.0367	0.7494	0.8445	0.8364	0.9469	0.9258	0.8081	0.7096	-	0.69	1.04	0.85	0.10	11.44
標準血清CA-6	0.7919	0.8004	0.9024	0.8765	0.7198	0.9324	0.6954	0.8041	0.8251	0.7936	0.8627	0.9241	0.7228	-	0.70	0.93	0.82	0.08	9.48
電解質人工尿標準候補品	0.7725	0.7808	0.9265	0.8744	0.6573	0.8996	0.7206	0.9314	0.8611	0.9469	0.8930	0.8979	0.8482	-	0.66	0.95	0.85	0.09	10.44
電解質尿標準候補品	0.7874	0.7934	0.9567	0.8880	0.6768	0.9113	0.7320	0.9842	0.8631	0.9346	0.8905	0.9005	0.7876	-	0.68	0.98	0.85	0.09	10.73
平均値	0.8004	0.8084	0.9251	0.8839	0.6860	0.9450	0.7244	0.8911	0.8464	0.9055	0.8930	0.8827	0.7671	#DIV/0!					

参加企業一覧

Na

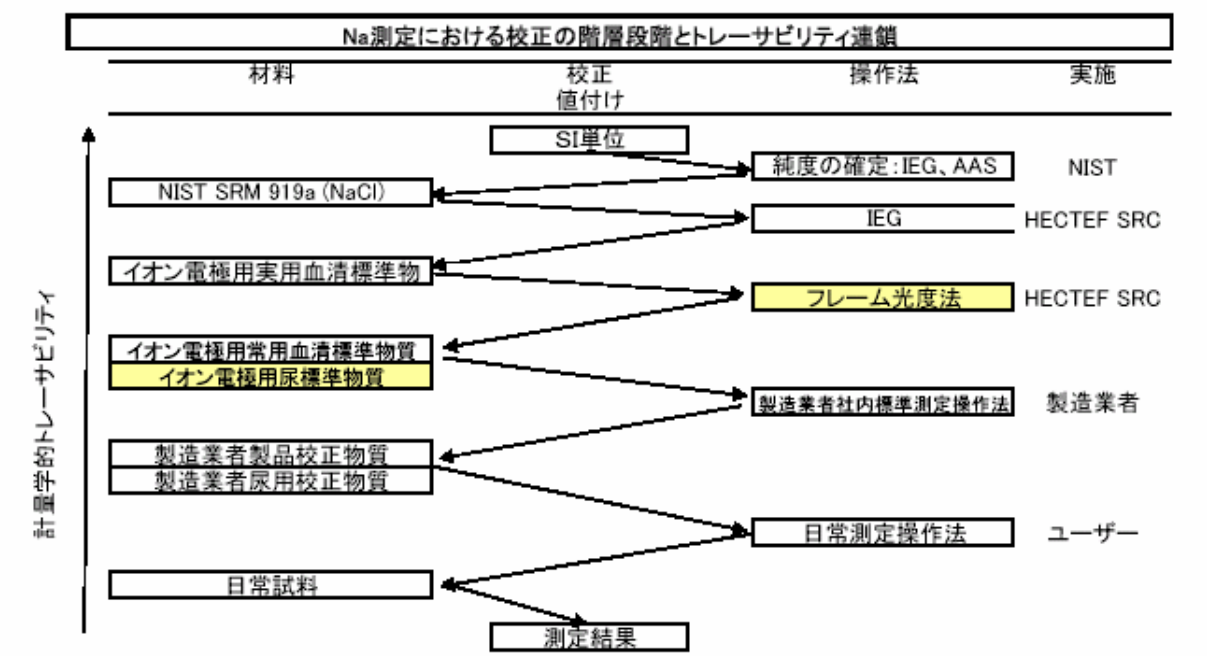
メーカー名	反応原理
B	イオン選択電極法
G	イオン選択電極法
I	イオン選択電極法
E	希釈電極法
D	イオン選択電極法(希釈法)
D	イオン選択性電極法(直接法)
F	イオン選択性電極法(直接法)
A	ポテンショメトリ法
C	ﾄﾞﾗｲｹﾐｽﾄﾘｰ法

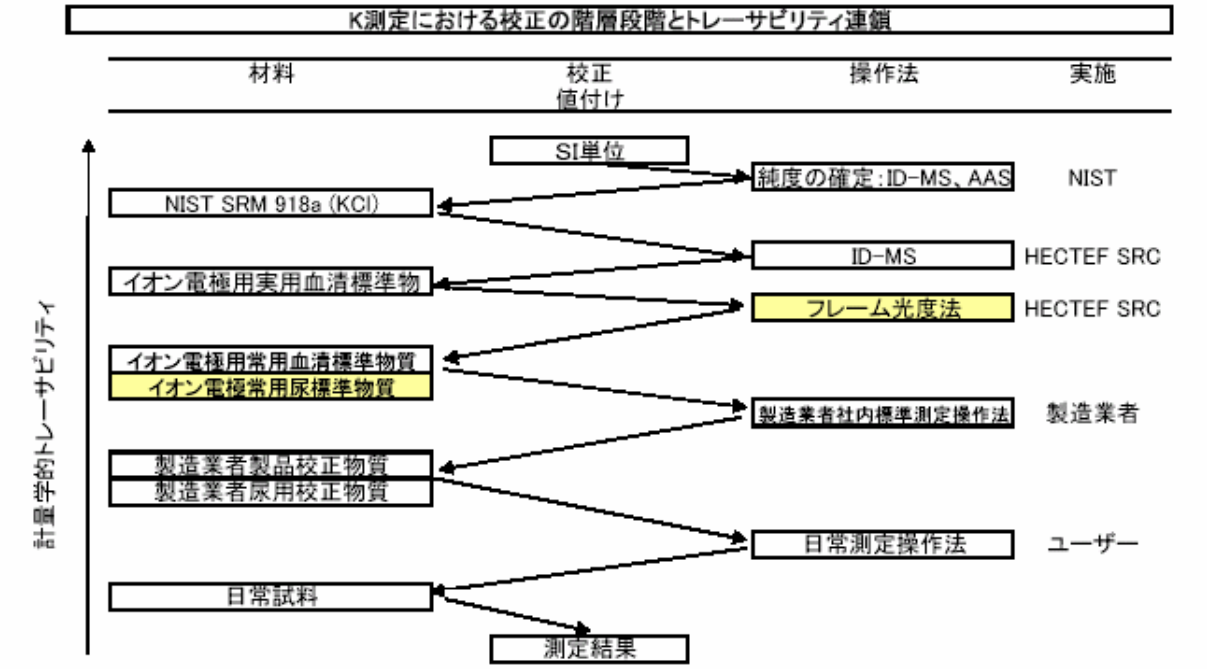
K

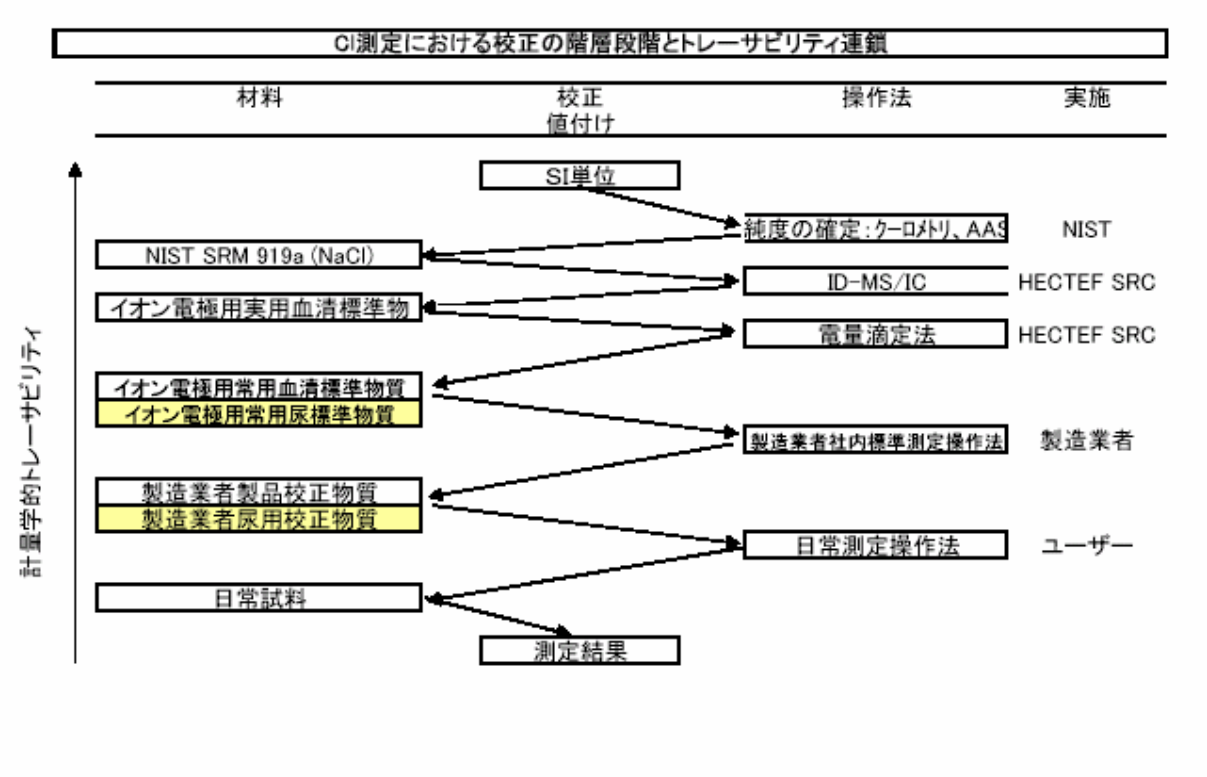
メーカー名	反応原理
B	イオン選択電極法
G	イオン選択電極法
I	イオン選択電極法
E	希釈電極法
D	イオン選択電極法(希釈法)
D	イオン選択性電極法(直接法)
F	イオン選択性電極法(直接法)
A	ポテンショメトリ法
C	ﾄﾞﾗｲｹﾐｽﾄﾘｰ法

Cl

メーカー名	反応原理
B	イオン選択電極法
G	イオン選択電極法
I	イオン選択電極法
E	希釈電極法
D	イオン選択電極法(希釈法)
D	イオン選択性電極法(直接法)
F	イオン選択性電極法(直接法)
A	ポテンショメトリ法
C	ﾄﾞﾗｲｹﾐｽﾄﾘｰ法


Na測定における校正の階層段階とトレーサビリティ連鎖
材料
校正
値付け
操作法
実施
計量学的トレーサビリティ
SI単位
純度の確定:IEG、AAS
NIST
NIST SRM 919a (NaCl)
IEG
HECTEF SRC
イオン電極用実用血清標準物
フレーム光度法
HECTEF SRC
イオン電極用常用血清標準物質
イオン電極用尿標準物質
製造業者社内標準測定操作法
製造業者
製造業者製品校正物質
製造業者尿用校正物質
日常測定操作法
ユーザー
日常試料
測定結果


K測定における校正の階層段階とトレーサビリティ連鎖
材料
校正
値付け
操作法
実施
計量学的トレーサビリティ
SI単位
純度の確定:ID-MS、AAS
NIST
NIST SRM 918a (KCl)
ID-MS
HECTEF SRC
イオン電極用実用血清標準物
フレーム光度法
HECTEF SRC
イオン電極用常用血清標準物質
イオン電極常用尿標準物質
製造業者社内標準測定操作法
製造業者
製造業者製品校正物質
製造業者尿用校正物質
日常測定操作法
ユーザー
日常試料
測定結果


Cl測定における校正の階層段階とトレーサビリティ連鎖
材料
校正
値付け
操作法
実施
計量学的トレーサビリティ
SI単位
純度の確定：クーロメトリ、AAS
NIST
NIST SRM 919a (NaCl)
ID-MS/IC
HECTEF SRC
イオン電極用実用血清標準物
電量滴定法
HECTEF SRC
イオン電極用常用血清標準物質
イオン電極用常用尿標準物質
製造業者社内標準測定操作法
製造業者
製造業者製品校正物質
製造業者尿用校正物質
日常測定操作法
ユーザー
日常試料
測定結果

２－４－２－２　尿中生化学成分

要旨

１）尿中生化学成分について、「尿中生化学成分の実試料標準物質候補品を調製・使用し、市販キットのデータ収束性について検証を行う」ことを目的とした調査研究を実施した。

２）測定項目は日常検査で汎用されている項目：カルシウム・マグネシウム・クレアチニン・グルコース・尿酸・尿素窒素・アミラーゼ、無機リンとした。
対象項目に関して調査した結果本邦にて入手可能な尿実試料標準物質は存在せず、各企業はNIST 等の高純度標準物質や HECTEF SRC 等の実用標準物質、常用標準物質を直近上位標準とした血清を対象としたトレーサビリティ体系となっていることがわかった。

３）本年度は市販キットの互換性の調査及び血清用実試料標準物質・尿実試料標準候補品を使用した収束性の検討の予備試験を実施した。方法は各社尿測定のプロトコルに従い患者尿 32 例を測定した。その際、実試料標準物質も検体として測定し収束性を確認した。解析方法は各キット間の収束性を CV により検証した。また、各標準品の反応性を試薬キャリブレーターによる測定値として各キット間で比較した。

４）その結果、尿中アミラーゼ以外は現行の状態で試薬間測定値の互換性は得られており、本実験で使用した標準候補品は血清標準品及び各社キャリブレーターと同等の収束性を示した。さらに各試薬の測定原理を考慮する事で収束性は改善されると考えられた。

５）今後の課題としては標準物質の濃度設定の検討が必要であり、また、測定原理により収束性が異なったため、標準物質候補品のマトリックスの検討が必要と思われる。さらにアミラーゼについては各標準品中のアイソザイムの存在比率と各試薬のアイソザイム対する反応性を考慮すれば収束性は改善されるものと考えられる。
なお、平成 18 年度は残る課題を解決して、実試料標準物質の作製作業を予定している。

１．目的

本調査研究項目群、C1（尿中電解質成分、尿中生化学成分、血清無機リン）内の尿中生化学成分について、「尿中生化学成分の実試料標準物質候補品を調製・使用し、市販キットのデータ収束性について検証を行う」ことが本調査研究の目的である。

なお、今回の尿中生化学成分に該当する項目はカルシウム・マグネシウム・クレアチニン・グルコース・尿酸・尿素窒素・アミラーゼ、無機リンとした。

２．委員会の構成

	氏名	所属
責任者	小林　隆	栄研化学株式会社
運営管理者（臨薬協）	小林　隆	栄研化学株式会社
柱 1／C1 担当	中野　頼人	株式会社シノテスト
実行計画作成者	五来　隆	株式会社カイノス
技術アドバイザー	桑　克彦	筑波大学大学院　助教授
技術アドバイザー	森下　芳孝	三重大学病院中央検査部技師長
技術担当者	山下　章吾	アークレイマーケティング株式会社
技術担当者	小林　隆	栄研化学株式会社
技術担当者	樋渡　亮二	オーソ・クリニカル・ダイアグノスティック株式会社
技術担当者	谷口　嘉之	オリエンタル酵母工業株式会社
技術担当者	五来　隆	株式会社カイノス
技術担当者	大和　隆	協和メデックス株式会社
技術担当者	吉田　敏之	シスメックス株式会社
技術担当者	田中　龍彦	株式会社シノテスト
技術担当者	根占　哲也	株式会社セロテック
技術担当者	斉藤　憲祐	デイド　ベーリング株式会社
技術担当者	瓶子　隆	デンカ生研株式会社
技術担当者	須釜　裕司	日東紡績株式会社
技術担当者	牧内　肇	富士写真フィルム株式会社
技術担当者	横田　敦子	ベックマン・コールター株式会社
技術担当者	竹森　圭二	ミズホメディー株式会社
技術担当者	秋元　一隆	株式会社三菱化学ヤトロン
技術担当者	吉海　毅	ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
技術担当者	花田　寿郎	和光純薬工業株式会社
技術担当者	細井　健二	第一化学薬品株式会社
技術担当者	瀬川　充	関東化学株式会社
技術担当者	水口　克彦	東洋紡績株式会社
技術担当者	久米　俊久	極東製薬工業株式会社

３．委員会の開催

（１）第一回会合：2005/11/21（月）13：00～15：00　（臨薬協会議室）

（２）第二回会合：2006/4/12（水）10：00～12：00　（臨薬協会議室）

４．調査研究の概要

（1）測定値の互換性の現状

1）現状の調査

① 市販されている標準物質

日本における尿中生化学成分項目の実試料標準物質は存在しないことが確認できた。

② 尿測定の実態調査

参加企業にアンケート調査を実施した結果、尿中生化学成分項目に関しては血清測定用の標準物質を使用し、その測定の多くは NIST 等の純物質系標準物質、HECTEF SRC より頒布されている実試料標準物質及び JCSS 標準品を直近上位標準としたトレーサビリティ体系となっていることがわかった。

2）現状把握のための実験

尿中生化学成分における試薬間測定値の互換性に関するデータは無い為、市販キットの互換性の調査及び実試料標準物質を使用した収束性の検討の予備試験を以下の通り実施した。

① 市販キャリブレーターによる収束性の現状

② HECTEF SRC 製造の血清標準物質による収束性の効果（AMY を除く）

CA-6（Ca、Mg）

GN3-6（CRE、UA、UN、Glu）

③ JCCLS 認証の JCERM による収束性の効果（AMY）

JCERM005

④ HECTEF SRC 製造の人工尿標準候補品（二種類・二濃度）、ヒト尿標準候補品（一種類・二濃度）による収束性の効果

方法は各社尿測定のプロトコルに従い患者尿 32 例を測定した。その際、上記②・③・④に関しても検体として測定し収束性を確認した（以下、②・③・④を標準品と総称する）。

3）実験結果

市販キットの収束性をキット間 CV により検証した。また、各標準品の反応性を試薬キャリブレーターによる測定値として各キット間で比較した。

① 尿中カルシウム（Ca）

20 試薬の各標準品による 32 検体の平均収束性は 8.4～11.2%であり、人工尿標準候補品①Level 1、Level 2、ヒト尿標準候補品 Level 1、Level 2 のいずれも血清標準品と同等の収束性が得られた。

o-CPC 法試薬のみ（13 試薬）の場合、各標準品による平均収束性は 7.8～8.6%であり、それ以外の測定法（9 試薬）の場合、各標準品による平均収束性は 8.6～14.1%であった。

② 尿中マグネシウム（Mg）

18 試薬の各標準品による 32 検体の平均収束性は 9.2～17.6%であり、人工尿標準候補品①Level 1、Level 2、ヒト尿標準候補品 Level 1、Level 2 のいずれも血清標準品と同等の収束性が得られた。化学法のみ（8 試薬）の場合、平均収束性は 9.2～23.5%、酵素法のみ（10 試薬）の場合、平均収束性は 8.3～10.0%であり、測定法により収束性に違いが見られた。

ドライケミストリー法の C 社、10 mg/dL 以上の直線性が得られない T 社（Ⅳ-2）を除外した各標準品による 32 検体の平均収束性は 9.0～10.4%であり、化学法のみの場合は

9.1～11.0%、酵素法のみの場合は 8.3～10.0%で、測定法に関わらず収束性が良好となった。

③ 尿中クレアチニン（CRE）

24 試薬の各標準品による 32 検体の平均収束性は 8.2～23.7%であった。GN3-6 M、H の収束性が悪い理由は、それぞれの濃度が低く（Ⅳ-3）、尿の測定条件だと希釈され、バラつきが大きくなったものと予想される。

ドライケミストリーの C 社、ヤッフェ法の J 社、N 社を除外した場合、平均収束性は 7.4～13.3%に収束した。

④ 尿中グルコース（Glu）

22 試薬の各標準品による 28 検体の平均収束性は 12.2～13.5%であった。グルコース測定の主な測定原理であるヘキソキナーゼ法を採用している試薬（16 試薬）の平均収束性（30 検体）は 10.4～11.3%であった。

測定値が明らかにおかしい N 社電極法、M 社、T 社、V 社を除外した 18 試薬の 30 検体の平均収束性は 7.8～8.2%であった。同様に M 社（GOD・POD 法）以外の 3 試薬を削除したヘキソキナーゼ法を採用している試薬の平均収束性（30 検体）は 7.9～8.7%であり、測定法間での差が見られなくなった。

⑤ 尿中尿酸（UA）

25 試薬の各標準品による 31 検体の平均収束性は 7.3～10.3%であった。

測定値が明らかにおかしい V 社製品-1 を除外した 24 試薬の 31 検体の平均収束性は 7.3～10.4%であった。

⑥ 尿中尿素窒素（UN）

30 試薬の各標準品による 32 検体の平均収束性は 13.6～23.4%であった。

測定値が明らかにおかしい C 社、T 社を除外した 28 試薬の 32 検体の平均収束性は 8.7～14.3%であった。

⑦ 尿中アミラーゼ（AMY）

24 試薬の試薬キャリブレーターによる平均収束性（32 検体）は 23.4%であった。JCERM による収束性は 29.4%であった。人工尿標準候補品①Level 1、Level 2、人工尿標準候補品②Level 1 による収束性は 21.7～23.0%であった。人工尿標準候補品②Level 2、ヒト尿標準候補品 Level 1、Level 2 による収束性は 57.5～75.6%であった。

人工尿標準候補品②Level 2、人尿標準候補品 Level 1、Level 2 の測定値が他試薬と比較して明らかにおかしいと思われる試薬（C 社、D 社、F 社、T 社）を除外した場合、人工尿標準候補品②Level 2 以外の標準品による収束性は 20.4～23.1%とほぼ同程度の収束性が得られた。

アミラーゼについては各標準品中の S 型､P 型のアイエンソザイムの混在比率が異なり、また、各試薬の各アイソエンザイムに対する反応性が異なるために各試薬間の収束性が 20%以下にならないものと考えられる（Ⅳ-7）。

⑧ 尿中無機リン（IP）

21 試薬の各標準品による 32 検体の平均収束性は 8.1～12.2%であった。無機リン測定の主な測定原理である酵素法を採用している試薬（17 試薬）の平均収束性（32 検体）は

6.2～12.7%であった。
測定値が明らかにおかしいV社（Ⅳ-8）を除外した20試薬の32検体の平均収束性は7.1～8.2%であった。同様にV社を削除した酵素法を採用している試薬の平均収束性（32検体）は6.2～6.7%であった。

４）今後の課題

本実験により尿中生化学成分における市販キットの互換性の調査及び実試料標準物質を使用した収束性が確認できた。

その結果、尿中アミラーゼ以外は現行の状態で試薬間測定値の互換性は得られており、本実験で使用した標準候補品は血清標準品と同等の収束性を示した。さらに各試薬の測定原理を考慮する事で収束性は改善されると考えられる。今後の課題としては標準物質の濃度設定の検討が必要であり、また、測定原理により収束性が異なったため、標準物質候補品のマトリックスの検討が必要と思われる。

アミラーゼについては各標準品中のアイソエンザイム（S型、P型）の存在比率が異なり、各試薬のアイソエンザイムに対する反応性が異なるために各試薬間の収束性が小さくならないと考えられる。

各標準品中のアイソエンザイムの存在比率と各試薬のアイソエンザイム対する反応性を考慮すれば収束性は改善されるものと考えられる。

今後の課題として各試薬のアイソエンザイムとの反応性の検討が必要である。

（２）標準化および標準物質の設定経過

（１）の結果に基づき、人工尿標準候補品により各社のキャリブレーターと同等の収束効果を確認した為、人工尿標準候補品を標準物質にすべく次のステップへ進むこととした。

（３）標準物質の設定

人工尿標準候補品をベースとして今後設定する。

（４）値付けの測定方法の選択

今回の標準候補品の値付けの方法はHECTEF SRCに一任した。HECTEF SRCが行なった方法は以下の通りである。CRE、Glu、UA、UN、AMYに関しては対象を血清とした標準的測定法である為、マトリックスの問題等今後検証すべき問題も存在する。

項目	較正物質	測定方法
u-Ca	SRM 915a ($CaCO_3$)	原子吸光光度法
u-Mg	SRM 929 (グルコン酸Mg)	原子吸光光度法
u-CRE	SRM 914a (CRE)	JSCC勧告法
u-Glu	SRM 917b (GLU)	JSCC勧告法
u-UA	SRM 913a (UA)	JSCC勧告法
u-UN	SRM 912a (Urea)	CDCレファレンス法
u-AMY	JCERM005	JCCLS-SOP法
u-IP	SRM200a (KH_2PO_4)	イオンクロマトグラフィー

５．標準物質の作製プロトコル

（１）トレーサビリティシステム

AMY 以外は SI 単位系を最上位に位置づける体系とした。

（２）性状規格

今後設定する。

（３）基準測定操作法（可能な場合）または共同実験

５．（４）の測定法の検証を含めて今後設定する。

（４）値付けの手順

今後設定する。

（５）認証値と不確かさ（共同実験の場合は ISO Guide35 に従う。その他 GUM による）

今後設定する。

６．今後の課題

平成 18 年度は、これまでの結果を基に実試料標準物質候補品作製のための本格的な作業を行う。主な作業としてはマトリックス、設定濃度、設定本数の検討であり、実試料標準物質候補品での収束性及び反応性の再検証の確認をした後に作製作業を行う。

７．結び

平成 17 年度の研究において、尿中生化学成分項目（Ca、Mg、CRE、Glu、UA、UN、AMY、IP）の実試料標準物質候補品の作製を行い、かつ予備検証試験も行い、その有用性について確認した。平成 18 年度は残る課題を解決して、実試料標準物質の作製作業を予定している。

Ⅳ-1　尿中カルシウム(Ca)

	試薬メーカー	測定原理	CA-6 M	CA-6 H	Liquichek Level1	Liquichek Level2	人工尿標準模擬補品① Level1	人工尿標準模擬補品① Level2	ヒト尿標準模擬補品 Level1	ヒト尿標準模擬補品 Level2
			9.56	11.63			5	10	5	10
1	B	o-CPC法	9.49	11.73	7.62	11.08	5.21	10.56	5.38	10.53
2	C	ﾄﾞﾗｲｹﾐｽﾄﾘｰ法	11.30	13.37	8.17	11.70	6.53	12.03	6.30	11.13
3	E	o-CPC法	9.63	11.83	7.53	11.07	4.80	10.17	5.03	10.27
4		ｱﾙｾﾅｿﾞⅢ法	9.53	11.70	7.47	10.63	4.73	10.07	5.20	10.20
5	G	o-CPC法	9.60	12.07	7.77	12.13	5.00	11.90	5.30	12.00
6	H	o-CPC法	9.41	11.67	7.32	11.04	4.62	10.37	4.92	10.60
7	I	ｱﾙｾﾅｿﾞⅢ法	10.00	12.03	7.47	10.90	5.00	10.37	5.17	10.40
8		o-CPCｷﾚｰﾄ比色法	9.07	11.33	7.27	10.70	4.77	10.57	5.03	10.57
9	J	OCPC法	8.60	10.83	7.10	10.77	4.77	10.70	4.87	10.57
10	K	OCPC法	9.47	11.70	7.53	11.13	4.87	10.47	5.10	10.57
11	L	OCPC法	9.50	11.67	7.30	11.00	4.87	10.63	5.03	10.53
12	M	ｸﾛﾛﾌｫｽﾌｫﾅｿﾞⅢ法	7.23	9.40	7.73	11.83	5.73	11.77	5.77	11.93
13	N	ｲｵﾝ選択電極法	9.10	11.17	8.07	12.30	5.20	10.47	5.40	10.33
14	P	ｸﾚｿﾞｰﾙﾌﾀﾚｲﾝｺﾝﾌﾟﾚｸｿﾝ(o-CPC)法	9.60	11.80	7.53	11.10	5.03	10.63	5.23	10.63
15	Q		9.28	11.68	8.01	11.98	5.42	11.93	5.51	11.74
16			9.41	11.63	7.99	11.83	5.50	12.25	5.80	12.25
17	R	MXB法	9.27	11.40	7.73	11.10	5.03	10.87	5.30	10.90
18	S	OCPC法	9.47	11.68	7.58	11.26	5.03	10.83	5.33	11.08
19	T	o-CPC法	9.37	11.77	7.57	11.50	5.13	11.40	5.40	11.17
20	U	酵素法	9.97	12.27	7.83	11.33	5.00	10.20	5.43	10.30
		最小値	7.23	9.40	7.10	10.63	4.62	10.07	4.87	10.20
		最大値	11.30	13.37	8.17	12.30	6.53	12.25	6.30	12.25
		平均値	9.41	11.64	7.63	11.32	5.11	10.91	5.33	10.89
		標準偏差	0.73	0.72	0.28	0.49	0.43	0.70	0.34	0.63
		C.V.%	7.72	6.19	3.74	4.32	8.49	6.40	6.34	5.79

Ⅳ-2 尿中マグネシウム(Mg)

	試薬メーカー	測定原理	CA-6 M	CA-6 H	Liquichek Level1	Liquichek Level2	人工尿標準候補品① Level1	人工尿標準候補品① Level2	ヒト尿標準候補品 Level1	ヒト尿標準候補品 Level2
			2.02	3.83			5	20	5	20
1	C	ﾄﾞﾗｲｹﾐｽﾄﾘｰ法	3.00	5.40	5.40	12.60	8.00	23.60	7.20	22.00
2	D	酵素(ICDH)法	1.90	3.60	4.73	11.00	4.73	18.37	4.63	18.57
3	E	ICDH法	1.90	3.70	4.87	11.17	4.80	18.50	4.73	18.47
4	F	酵素法	2.17	4.00	5.20	11.60	5.10	19.20	5.10	19.70
5	G	酵素法	2.10	3.90	5.20	12.33	5.13	21.40	5.20	22.10
6	H	ｷｼﾘｼﾞﾙﾌﾞﾙｰ比色法	2.15	4.17	5.24	12.29	5.23	21.04	5.22	21.82
7	I	ICDH･UV法	2.00	3.83	4.97	11.27	5.00	19.60	4.93	20.07
8	J	MTB錯体測定法	2.13	4.00	5.20	11.73	5.10	19.53	5.00	19.70
9	K	酵素法	2.00	3.70	4.97	11.07	4.97	19.20	4.87	19.77
10	L	酵素法	1.88	3.68	5.04	12.20	4.86	19.94	4.89	20.56
11	N	ｶﾙﾏｶﾞｲﾄ法	2.13	3.96	5.57	12.31	5.34	20.37	5.27	20.77
12	P	酵素法(詳細は添付文書参照)	2.10	3.90	5.07	11.73	5.10	19.67	5.00	20.20
13	Q		2.03	3.69	4.92	12.44	4.90	20.89	4.90	20.69
14			2.29	4.08	4.97	9.17	4.87	21.53	4.93	21.53
15	R	酵素法	2.03	3.80	5.03	11.70	5.00	20.43	5.00	20.97
16	S	ｷｼﾘｼﾞﾙﾌﾞﾙｰ法	2.23	3.99	5.25	10.90	5.02	20.02	5.05	19.84
17	T	ｷｼﾘｼﾞﾙﾌﾞﾙｰ法	2.00	3.73	5.07	10.80	5.03	12.90	5.03	12.90
18	U	酵素法	2.13	3.93	5.33	12.10	5.00	19.50	5.07	19.77
		最小値	1.88	3.60	4.73	9.17	4.73	12.90	4.63	12.90
		最大値	3.00	5.40	5.57	12.60	8.00	23.60	7.20	22.10
		平均値	2.12	3.95	5.11	11.58	5.18	19.76	5.11	19.97
		標準偏差	0.25	0.40	0.21	0.83	0.72	2.11	0.54	2.05
		C.V.%	11.63	10.01	4.01	7.21	13.91	10.69	10.66	10.28

Ⅳ-3　尿中クレアチニン（CRE）

	試薬メーカー	測定原理	GN3-6 M	GN3-6 H	GN3-6 HH	Liquichek Level1	Liquichek Level2	人工尿標準物質補品① Level1	人工尿標準物質補品① Level2	人工尿標準物質補品② Level1	人工尿標準物質補品② Level2	ヒト尿標準物質補品 Level1	ヒト尿標準物質補品 Level2
			0.75	1.78	6.6			10	50	10	50	17.8	46.1
1	B	酵素法	0.77	1.82	6.71	66.90	154.66	10.09	51.02	10.07	51.11	17.86	47.27
2	C	ﾄﾞﾗｲｹﾐｽﾄﾘｰ法	0.76	1.80	6.66	66.90	154.66	10.04	50.51	10.03	50.56	17.83	46.69
3	E	酵素法	0.75	1.78	6.64	67.66	158.04	10.19	51.19	10.15	50.95	17.91	47.12
4	F	酵素法	0.81	1.86	6.70	65.00	153.00	10.24	51.23	10.26	51.36	17.77	46.76
5	G	酵素法	0.77	1.82	6.75	67.92	158.20	10.25	51.59	10.23	51.22	17.79	47.26
6	H	酵素法	0.76	1.79	6.59	65.82	151.69	9.98	49.97	9.99	50.21	17.67	46.36
7	I	酵素比色法	0.79	1.89	6.81	64.83	147.77	9.97	49.42	10.10	50.48	17.66	46.48
8	J	ﾔｯﾌｪ法	1.07	2.48	7.89	69.09	161.53	9.63	49.29	9.61	50.11	16.89	46.81
9	K	酵素法	0.78	1.81	6.62	67.23	153.54	10.13	50.85	10.04	50.63	17.61	46.50
10	L	酵素法	0.78	1.83	6.71	65.44	152.78	10.05	50.84	10.00	51.12	17.71	47.12
11	N	ﾔｯﾌｪ ﾚｰﾄ法	0.80	1.90	6.70	73.63	171.90	10.43	52.43	10.30	52.00	18.47	48.70
12	O	酵素法	0.78	1.79	6.55	64.79	150.43	9.82	49.52	9.88	49.74	17.29	45.75
13	P	酵素法	0.81	1.88	6.72	65.47	148.37	9.93	48.60	9.97	48.80	17.27	45.37
14	Q		0.74	1.74	6.44	65.96	148.32	9.99	49.63	10.03	49.47	16.85	44.61
15			0.74	1.75	6.58	67.83	156.98	10.03	50.51	10.05	50.55	17.76	46.85
16			0.88	1.81	6.15	61.19	162.92	9.95	49.55	10.03	47.00	17.12	43.48
17	R	ｸﾚｱﾁﾅｰｾﾞ･HMMPS法	0.77	1.81	6.59	65.35	152.13	10.03	49.97	10.04	49.71	17.47	45.91
18	S	酵素法	0.80	1.86	6.77	66.91	146.87	10.23	50.95	10.22	50.87	17.88	46.88
19	T	ｸﾚｱﾁﾅｰｾﾞ･POD法	0.76	1.81	6.70	66.90	124.57	10.22	51.36	10.26	51.37	18.05	47.38
20	U	酵素法	0.76	1.80	6.78	69.22	157.38	9.87	52.06	9.44	48.63	17.51	46.80
21	V	酵素法 ﾍﾟﾙｵｷｼﾀﾞｰｾﾞ法	0.76	1.90	6.90	73.61	172.07	10.56	55.25	10.62	55.52	19.00	51.57
22		酵素法	0.72	1.82	6.84	74.68	173.97	10.75	56.08	10.74	56.06	19.19	51.93
23			0.69	1.80	6.74	70.80	163.92	10.20	52.91	10.28	52.99	18.46	49.47
24			0.65	1.82	6.67	70.68	163.92	10.42	52.96	10.25	53.55	18.40	49.54
		最小値	0.65	1.74	6.15	61.19	124.57	9.63	48.60	9.44	47.00	16.85	43.48
		最大値	1.07	2.48	7.89	74.68	173.97	10.75	56.08	10.74	56.06	19.19	51.93
		平均値	0.78	1.85	6.72	67.66	155.82	10.13	51.15	10.11	51.00	17.81	47.19
		標準偏差	0.08	0.14	0.29	3.18	10.21	0.25	1.80	0.27	2.00	0.58	1.92
		C.V.%	9.73	7.64	4.31	4.70	6.55	2.43	3.52	2.64	3.92	3.25	4.07

Ⅳ-4　尿中グルコース(Glu)

	試薬メーカー	測定原理	GN3-6 M	GN3-6 H	GN3-6 HH	Liquichek Level1	Liquichek Level2	人工尿標準物質① Level1	人工尿標準物質① Level2	人工尿標準物質② Level1	人工尿標準物質② Level2	ヒト尿標準物質 Level1	ヒト尿標準物質 Level2
			73.9	132.5	239			40	200	40	200	40.4	198
1	B	酵素(HK-G-6-PDH)法	74.6	133.7	240.3	29.1	288.7	40.2	200.2	40.0	200.2	41.0	199.7
2	C	ﾄﾞﾗｲｹﾐｽﾄﾘｰ法	88.3	155.0	288.3	30.7	302.7	42.7	204.3	42.7	205.7	42.7	205.0
3	E	ﾍｷｿｷﾅｰｾﾞ法	73.3	131.3	235.0	28.7	289.3	39.7	198.3	40.7	199.7	40.7	200.3
4		GLUCDH法	74.0	131.3	234.0	30.0	285.0	41.0	196.7	39.7	197.7	40.0	193.7
5	F	酵素法	73.3	132.3	237.3	28.7	284.3	40.0	198.3	39.7	196.7	37.7	197.0
6	G	ﾍｷｿｷﾅｰｾﾞ法	73.0	131.7	236.3	30.0	287.7	40.0	197.7	39.0	199.0	41.0	203.0
7	H	HK-G-6-PDH法	72.3	128.9	233.9	28.6	282.9	39.5	195.5	38.9	195.2	40.1	198.0
8	I	ﾍｷｿｷﾅｰｾﾞ･UV法	76.0	134.0	242.3	30.0	289.3	40.3	197.7	40.3	200.3	42.3	202.0
9		ﾌﾞﾄﾞｳ糖脱水素酵素UV法	75.3	132.0	240.7	30.3	287.7	40.7	197.0	41.0	200.3	40.7	199.3
10	J	ﾍｷｿｷﾅｰｾﾞ法	74.7	132.0	236.7	31.3	290.7	39.7	196.3	40.0	197.7	42.0	199.0
11	K	HK-G6PD法	75.0	133.7	241.3	29.3	290.7	40.0	200.3	39.3	199.0	40.0	199.3
12	L	HK G6-PDH法	74.3	133.3	240.3	29.7	289.0	40.3	199.0	40.0	200.7	41.0	200.3
13	M	GOD･POD法	84.0	142.3	241.7	34.0	305.3	44.7	213.7	45.0	207.7	44.7	210.7
14	N	酸素消費電極法	72.0	128.0	231.3	31.3	302.3	40.3	194.3	38.7	194.0	40.3	193.7
15		ﾍｷｿｷﾅｰｾﾞ法	69.0	123.3	218.7	28.3	276.0	35.7	182.3	35.7	181.0	38.7	181.0
16	O	ﾍｷｿｷﾅｰｾﾞ･UV法	74.0	130.7	234.3	29.0	282.7	39.3	196.7	39.3	197.7	41.3	197.3
17	P	ﾍｷｿｷﾅｰｾﾞ･UV法	74.3	133.3	241.0	29.0	288.7	40.3	201.7	41.0	200.3	39.0	199.3
18	Q		74.1	131.6	239.5	29.7	289.0	40.6	199.0	40.6	201.0	41.1	201.3
19	R	ﾍｷｿｷﾅｰｾﾞ･G-6-PDH法	74.3	134.3	241.0	30.0	293.7	40.7	202.0	41.0	202.0	41.3	204.3
20	S	酵素法(ﾍｷｿｷﾅｰｾﾞ:HK:法)	76.2	135.6	243.3	29.8	292.7	41.3	204.4	40.8	203.0	41.4	203.8
21	T	ｸﾞﾙｺｰｽ脱水素酵素法	73.0	131.3	237.3	29.0	288.3	40.0	199.3	40.0	199.3	40.7	200.3
22	V	酵素法 ﾍｷｿｷﾅｰｾﾞ法	75.3	134.0	242.6	29.3	292.5	40.1	201.6	40.5	201.1	40.5	204.1
		最小値	69.0	123.3	218.7	28.3	276.0	35.7	182.3	35.7	181.0	37.7	181.0
		最大値	88.3	155.0	288.3	34.0	305.3	44.7	213.7	45.0	207.7	44.7	210.7
		平均値	75.0	133.3	239.9	29.8	290.0	40.3	198.9	40.2	199.1	40.8	199.7
		標準偏差	4.0	5.9	12.1	1.2	6.7	1.6	5.5	1.7	5.1	1.4	5.6
		C.V.%	5.3	4.4	5.0	4.2	2.3	3.9	2.8	4.2	2.5	3.5	2.8

Ⅳ-5　尿中尿酸(UA)

	試薬メーカー	測定原理	GN3-6 M	GN3-6 H	GN3-6 HH	Liquichek Level1	Liquichek Level2	人工尿標準物質品① Level1	人工尿標準物質品① Level2	人工尿標準物質品② Level1	人工尿標準物質品② Level2	ヒト尿標準物質品 Level1	ヒト尿標準物質品 Level2
			4.35	7.71	11.11			5	15	5	15	7.5	14.4
1	B	ウリカーゼPOD法	4.49	7.98	11.44	9.04	15.88	4.85	14.74	4.96	14.91	7.45	14.69
2	C	ドライケミストリー法	4.03	7.70	11.37	8.43	16.50	4.40	13.20	4.40	16.87	6.97	15.40
3	E	ウリカーゼ・POD法	4.40	7.90	11.40	9.17	16.10	4.90	14.70	4.93	14.87	7.37	14.43
4	F	ウリカーゼ・ペルオキシダーゼ法	4.30	7.90	11.33	9.13	16.03	4.93	14.87	4.90	14.90	7.33	14.47
5	G	Uricase-EHSPT法	4.40	7.90	11.47	9.00	16.13	4.90	15.10	4.80	14.97	7.50	14.97
6	H	ウリカーゼ・POD法	4.33	7.78	11.19	8.95	15.75	4.91	14.74	4.87	14.77	7.30	14.39
7		ウリカーゼ・POD法	4.47	7.92	11.45	9.09	16.02	4.93	14.79	4.91	14.90	7.46	14.82
8	I	ウリカーゼ・POD比色法	4.40	7.87	11.30	8.87	15.70	4.87	14.47	4.93	14.67	7.37	14.27
9	J	ウリカーゼUV法	4.27	7.50	10.63	9.30	15.97	4.80	14.07	4.63	14.40	6.97	13.40
10	K	酵素法	4.27	7.90	11.53	9.03	16.30	4.80	14.90	4.77	14.97	7.30	14.77
11	L	酵素法	4.43	7.83	11.27	8.73	15.53	4.70	14.47	4.73	14.43	7.20	14.27
12	M	ウリカーゼ・POD法	4.40	8.10	11.30	11.40	17.30	5.90	16.00	5.90	16.30	9.00	16.00
13	N	ウリカーゼ・パーオキシダーゼ法	4.30	7.60	10.83	10.07	17.17	6.07	15.60	5.97	16.17	8.50	15.63
14	O	ウリカーゼ・ペルオキシダーゼ法	4.23	7.63	11.00	8.77	15.60	4.83	14.43	4.77	14.53	7.20	14.10
15	P	ウリカーゼ・ペルオキシダーゼ法	4.40	7.93	11.30	9.03	15.87	4.93	14.87	4.87	14.93	7.33	14.50
16	Q		4.29	7.78	11.28	9.06	15.80	4.89	14.78	4.89	14.76	7.31	14.35
17			4.35	7.89	11.46	9.18	16.22	5.00	15.11	5.01	15.23	7.50	14.82
18	R	ウリカーゼ・HMMPS法	4.40	7.80	11.20	9.03	15.90	4.93	14.90	5.00	14.80	7.30	14.40
19	S	酵素法(ウリカーゼ・POD法)	4.47	8.01	11.53	8.95	15.83	5.05	15.00	5.00	14.97	7.48	14.64
20	T	ウリカーゼ・POD法	4.30	7.70	11.10	8.87	15.67	4.80	14.57	4.83	14.60	7.20	14.20
21	U	酵素法	4.47	7.87	11.27	9.10	15.87	4.77	14.47	4.90	14.47	7.40	14.93
22	V	酵素法 ウリカーゼペルオキシダーゼ法	4.47	8.07	11.53	9.37	16.33	5.07	15.30	4.97	15.10	7.47	15.10
23		酵素法	4.50	8.00	11.83	9.57	16.47	4.93	15.33	4.97	15.13	7.57	15.47
24			4.70	8.53	12.10	9.57	16.87	5.13	15.50	5.10	15.53	7.60	15.57
25			4.60	8.27	11.30	9.27	16.30	5.20	15.17	4.97	15.10	7.47	14.90
		最小値	4.03	7.50	10.63	8.43	15.53	4.40	13.20	4.40	14.40	6.97	13.40
		最大値	4.70	8.53	12.10	11.40	17.30	6.07	16.00	5.97	16.87	9.00	16.00
		平均値	4.39	7.89	11.34	9.20	16.12	4.98	14.84	4.96	15.05	7.46	14.74
		標準偏差	0.13	0.21	0.29	0.56	0.46	0.34	0.54	0.33	0.60	0.42	0.57
		C.V.%	2.98	2.69	2.53	6.05	2.84	6.81	3.66	6.56	3.95	5.69	3.88

Ⅳ-6　尿中尿素窒素(UN)

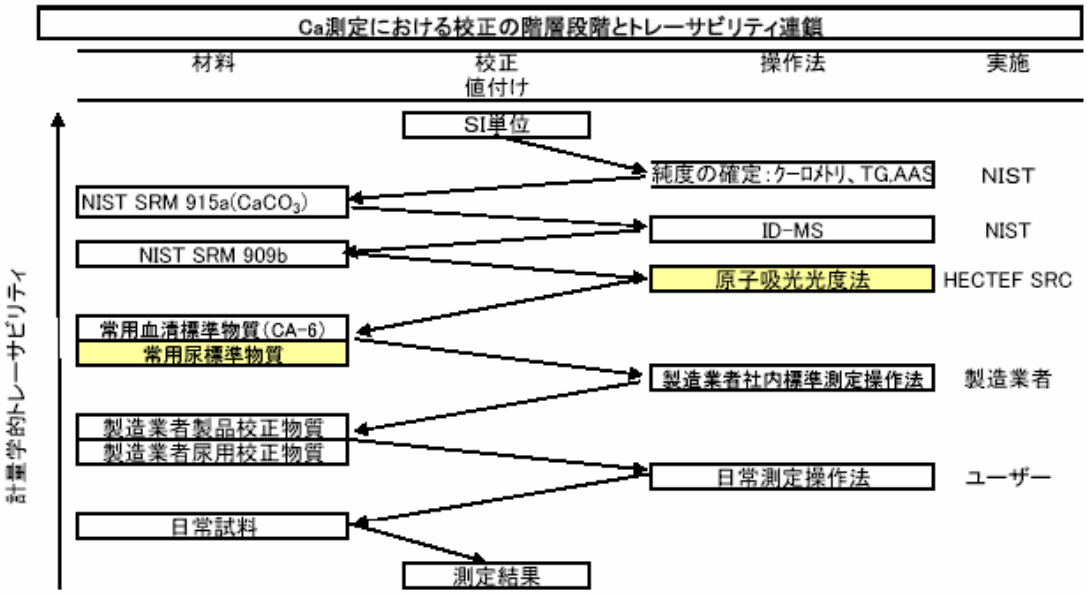
	試薬メーカー	測定原理	GN3-6 M	GN3-6 H	GN3-6 HH	Liquichek Level1	Liquichek Level2	人工尿標準物質品① Level1	人工尿標準物質品① Level2	人工尿標準物質品② Level1	人工尿標準物質品② Level2	ヒト尿標準物質品 Level1	ヒト尿標準物質品 Level2
			10	24.8	44.1			100	300	100	300	127	342
1	B	ウレアーゼ GLDH(ICDH)法	10.0	25.0	43.8	408.1	750.2	100.0	298.0	99.6	300.8	124.3	344.4
2	C	ドライケミストリー法	10.0	24.9	44.0	408.1	750.2	100.0	299.0	99.8	300.4	125.7	343.2
3	D	酵素法	10.0	25.0	44.7	405.0	752.0	99.7	283.0	99.0	295.3	122.3	324.0
4	E	ウレアーゼ・GLDH・ICDH・UV法(アンモニア消去法	10.1	24.3	43.2	403.3	744.9	97.9	279.6	98.0	282.4	120.8	323.5
5		ウレアーゼ・ADP比色またはUV法(回避法)	9.3	23.8	42.6	423.0	785.2	97.5	307.4	97.7	303.7	121.7	344.9
6	F	ウリカーゼ・ペルオキシダーゼ法	10.0	25.0	44.0	401.0	753.0	99.0	299.3	98.3	296.7	123.0	341.0
7		ウレアーゼ UV法 LEDアンモニア回避法	10.0	24.0	43.0	390.3	732.0	95.7	290.7	94.7	288.0	119.3	333.7
8	G	Urease-GLDH法	10.2	25.1	44.0	424.0	774.0	100.0	290.0	99.0	290.3	122.3	353.0
9	H	ウレアーゼ・GLDH法(ICDH)	10.9	24.8	44.2	403.2	738.1	99.5	296.1	98.3	295.9	123.8	341.3
10	I	ウレアーゼ・GLDH・UV法	10.3	26.0	45.7	411.0	762.0	100.0	298.0	102.0	302.0	125.0	344.0
11		ウレアーゼ・GLDH・ICDH・UV法	10.3	25.7	45.3	409.7	759.3	101.0	298.7	101.3	302.3	125.7	347.7
12		ウレアーゼ・GLDH・ICDH・UV法	10.3	25.7	45.0	411.7	765.3	99.3	296.7	100.0	301.3	123.7	340.7
13	J	ウレアーゼ UV法 アンモニア未消去	13.0	27.3	50.7	518.0	847.3	106.3	317.0	107.0	326.0	145.0	381.3
14	K	ウレアーゼ GLDH法(アンモニア消去)	11.0	26.0	45.3	405.7	747.0	97.7	294.3	98.3	290.3	120.7	321.0
15	L	ウレアーゼ GLDH・アンモニア消去系	10.0	24.5	43.6	379.3	725.3	97.8	277.0	98.6	286.1	122.2	315.6
16	M	BPB指示薬法	10.7	27.0	48.3	430.7	747.0	92.3	286.7	92.3	289.0	115.0	340.3
17	N	ウレアーゼ UV法	11.0	25.7	44.7	468.7	766.7	106.0	300.3	106.3	307.7	138.0	364.0
18	O	UV法 LEDアンモニア回避法	10.0	24.8	44.0	405.3	755.7	101.5	296.8	101.2	296.3	124.6	338.3
19	P	LEDアンモニア回避法	10.0	24.7	43.7	408.0	748.3	99.7	294.7	98.7	294.0	124.3	342.0
20	Q		9.8	24.9	44.2	410.5	693.9	98.3	273.0	97.7	275.6	125.9	331.1
21			10.4	25.7	45.3	483.0	810.6	99.9	283.6	101.2	285.2	132.2	340.2
22	R	ウレアーゼ・GIDH法、アンモニア消去法	10.0	24.7	44.3	440.0	809.3	100.7	307.3	99.0	307.3	124.7	351.7
23		ウレアーゼ・GIDH法、アンモニア非消去	10.7	25.7	46.0	488.3	842.3	99.0	306.7	101.0	311.7	135.0	369.0
24	S	酵素法(ウレアーゼ・LED・UV法)	9.9	24.4	43.4	403.1	712.2	99.3	300.0	98.8	295.4	124.2	345.2
25	T	ウレアーゼ・LEDH法	10.2	25.0	44.7	282.3	230.9	99.4	292.5	99.7	291.8	123.3	328.7
26	U	酵素法	10.0	25.0	44.3	417.3	759.3	98.7	304.7	91.7	281.7	122.0	343.7
27	V	酵素法 ウレアーゼ GLDH, UV法(消去法)	7.1	25.8	44.1	439.6	807.9	107.6	327.6	106.5	318.8	132.2	367.1
28		酵素法 LED系 アンモニア回避法	10.1	23.6	43.4	414.6	753.7	101.2	301.1	98.3	299.9	125.8	346.7
29			10.2	24.7	43.9	413.0	616.0	100.5	303.8	99.9	302.6	130.0	353.6
30			9.6	23.1	40.8	380.0	569.4	92.5	279.6	93.1	278.4	120.2	326.3
		最小値	7.1	23.1	40.8	282.3	230.9	92.3	273.0	91.7	275.6	115.0	315.6
		最大値	13.0	27.3	50.7	518.0	847.3	107.6	327.6	107.0	326.0	145.0	381.3
		平均値	10.2	25.1	44.5	416.2	733.6	99.6	296.1	99.2	296.6	125.4	342.9
		標準偏差	0.9	0.9	1.7	40.2	109.7	3.2	11.7	3.5	11.3	6.0	14.7
		C.V.%	8.5	3.6	3.9	9.7	15.0	3.2	3.9	3.6	3.8	4.8	4.3

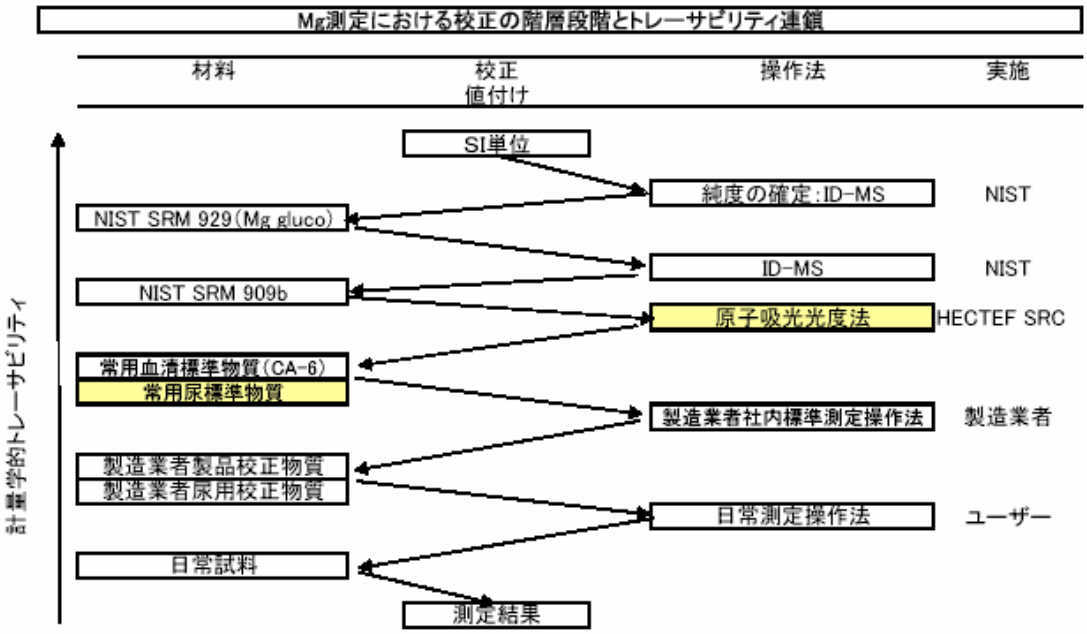
Ⅳ-7　尿中アミラーゼ(AMY)

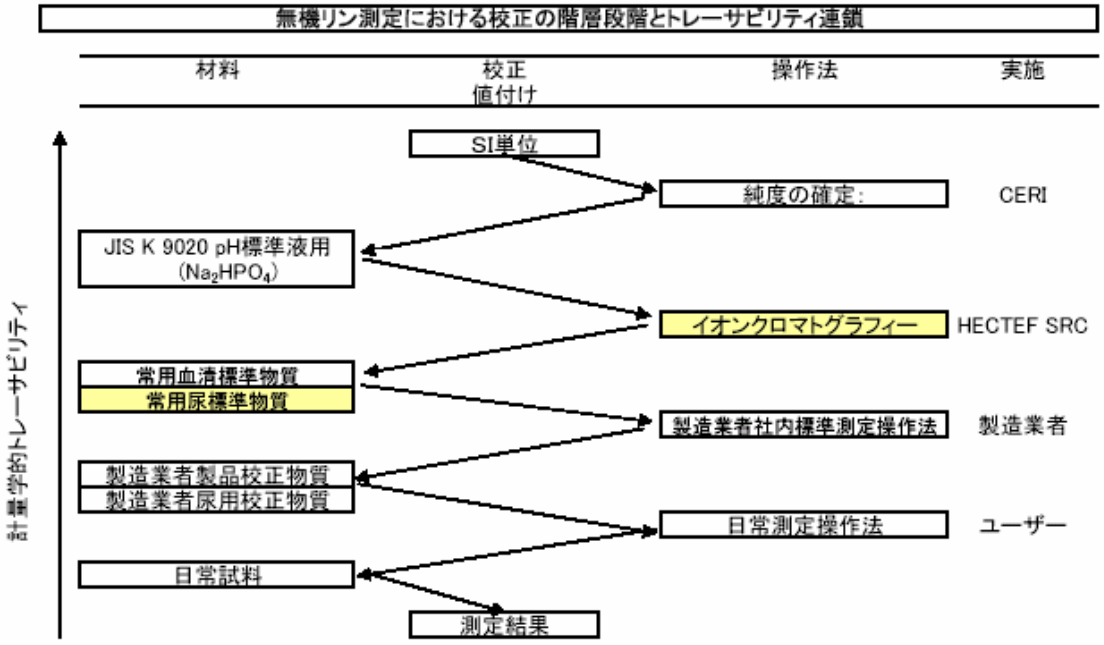
	試薬メーカー	測定原理	JCERM	Liquichek	Liquichek	人工尿標準候補品③	人工尿標準候補品①	人工尿標準候補品②	人工尿標準候補品②	ヒト尿標準候補品	ヒト尿標準候補品
				Level1	Level2	Level1	Level2	Level1	Level2	Level1	Level2
			352			70	150	70	150	59	136
1	B	B-pNP-G5法	343.5	52.0	175.8	67.7	148.6	64.4	127.0	54.8	134.4
2	C	ﾄﾞﾗｲｹﾐｽﾄﾘｰ法	113.3	44.3	131.0	46.3	127.3	46.3	44.7	17.3	39.0
3	D	G3CNP法	332.0	54.3	177.7	60.3	149.7	60.0	28.0	34.7	47.0
4	E	IFCC標準化対応法(G3-CNP基質)	354.3	57.3	189.0	70.3	162.3	67.3	136.0	56.0	147.0
5	F	Gal-G2-CNP	308.7	50.0	166.3	63.7	148.7	60.0	19.3	9.3	29.7
6	G	Gal-G5-pNP法	350.0	52.0	178.0	67.0	149.3	62.0	129.7	54.0	134.7
7	H	ﾌﾞﾛｯｸﾄpNP-G7法	342.5	59.1	187.8	68.6	153.4	66.3	122.4	55.0	132.8
8		ﾌﾞﾛｯｸﾄpNP-G5法	344.9	51.6	174.8	67.1	150.1	64.9	120.8	54.8	131.5
9	I	Et-G7-pNP基質法	351.3	55.3	186.0	64.0	147.7	57.0	100.7	48.7	138.0
10		Gal-G2-CNP基質法	354.3	56.7	190.3	72.7	168.3	65.3	115.3	54.7	156.3
11	J	G3-CNP法	260.0	38.0	134.7	48.0	111.7	45.0	87.7	37.3	110.3
12	K	Et-G7pNP法	355.7	54.7	182.7	63.3	145.0	61.0	117.7	51.3	145.0
13	L	Gal-G5-PNP	348.3	51.7	173.3	66.0	149.7	65.0	118.7	54.7	144.3
14	M	G5-PNP法	320.7	42.0	145.7	58.7	121.3	52.7	100.3	46.0	118.7
15	N	ｵﾘｺﾞ糖基質UV法 G-4	429.0	72.3	247.7	81.0	176.3	75.3		59.3	114.0
16	O	IFCC標準化対応法(Gal-G-4-CNP)	351.3	52.3	176.0	70.0	154.0	65.0	131.0	54.3	136.7
17		IFCC標準化対応法(Gal-G-2-CNP)	308.3	50.0	164.7	69.7	154.0	64.0	129.0	52.0	135.0
18	P	JSCC(IFCC)標準化対応法	355.3	55.3	186.0	67.3	156.0	55.3	82.7	32.7	106.0
19	Q		353.3	56.6	186.6	68.3	152.0	63.0	120.9	53.5	141.2
20	R	BG5P基質法	341.3	50.3	169.3	64.3	122.0	66.0	151.3	55.0	133.7
21	S	Gal-G2CNP基質法(JSCC標準化対応)	306.6	58.7	160.3	58.2	144.3	53.3	99.8	49.0	121.9
22	T	G3-CNP法	330.0	53.3	179.0	63.3	145.7	62.3	46.0	17.0	40.7
23	U	GalG4-CNP法	352.3	52.0	173.7	65.0	151.0	61.0	112.0	53.7	127.3
24	V		315.3	50.7	167.0	69.7	153.7	65.7	117.7	54.3	151.3
		最小値	113.3	38.0	131.0	46.3	111.7	45.0	19.3	9.3	29.7
		最大値	429.0	72.3	247.7	81.0	176.3	75.3	151.3	59.3	156.3
		平均値	330.1	52.9	175.1	65.0	147.6	61.2	102.5	46.2	117.4
		標準偏差	54.9	6.5	22.1	7.3	14.5	6.8	35.7	14.0	37.9
		C.V.%	16.6	12.2	12.6	11.2	9.8	11.1	34.8	30.4	32.3

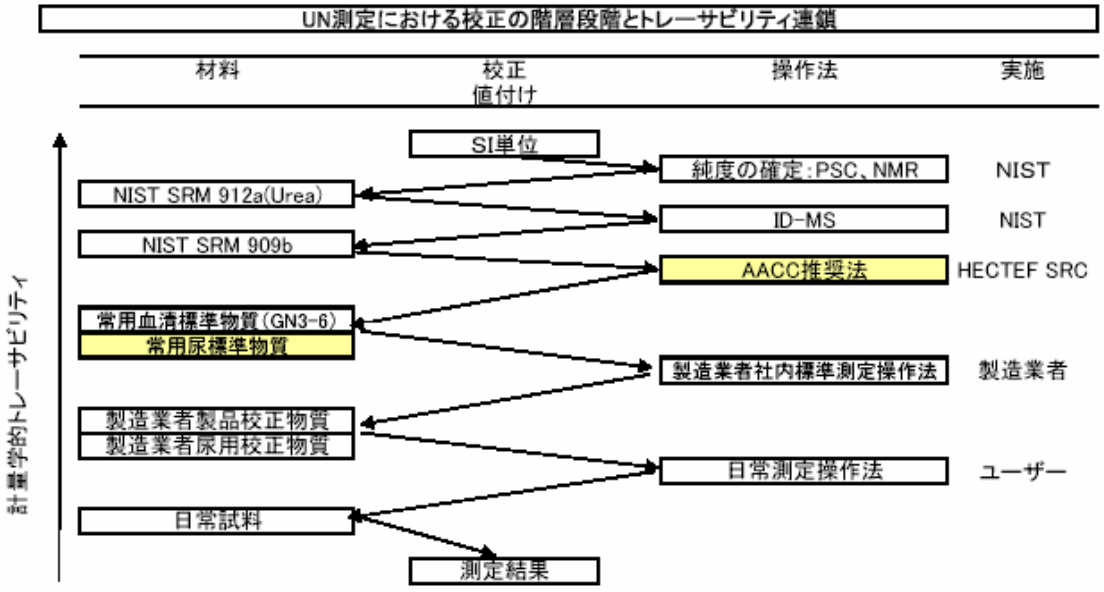
Ⅳ-8　尿中無機リン(IP)

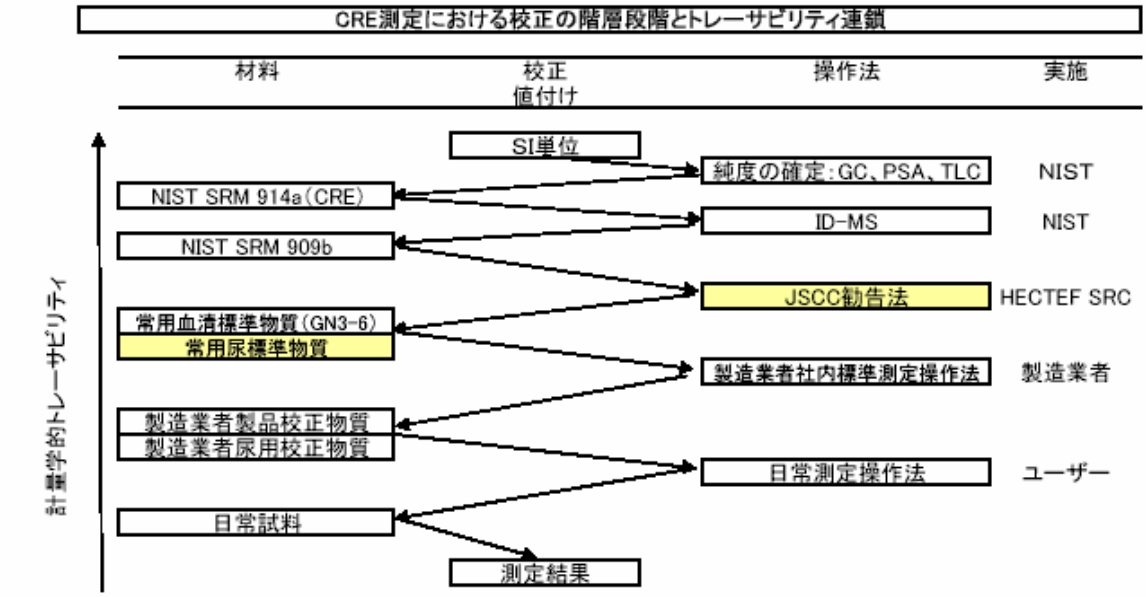
	試薬メーカー	測定原理	Liquichek Level1	Liquichek Level2	人工尿標準校正品② Level2	ヒト尿標準校正品 Level1	ヒト尿標準校正品 Level2
					40	10	40
1	C	ﾄﾞﾗｲｹﾐｽﾄﾘｰ法	26.4	55.0	46.6	9.9	44.0
2	E	PNP-XDH法	25.1	49.2	38.7	9.5	39.4
3		MPL法	25.3	50.2	38.9	9.5	39.7
4	F	酵素法	24.7	50.3	39.0	9.1	39.5
5		酵素法	25.8	51.3	39.7	9.6	40.4
6	G	酵素法	26.3	52.5	40.6	9.8	41.6
7	H	酵素法	25.3	50.0	39.3	9.4	40.3
8	I	酵素比色法(PNP-XOD-POD系)	25.2	50.8	39.7	9.4	40.0
9		酵素比色法(PNP-XOD-POD系)	25.3	50.9	39.6	9.4	40.4
10	J	ﾓﾘﾌﾞﾃﾞﾝ酸UV法	28.3	56.0	41.4	9.7	40.5
11	K	酵素法	25.9	51.4	39.3	9.6	40.0
12	L	酵素法	25.6	50.8	39.8	9.6	40.9
13	N	ﾓﾘﾌﾞﾃﾞﾝ酸UV法	26.5	53.5	40.5	9.6	40.4
14	O	酵素法	25.2	50.0	38.8	9.4	39.8
15	P	酵素法	25.0	49.2	39.1	9.4	39.7
16	Q		25.8	51.9	36.9	9.2	37.6
17	R	PNP･XDH法	26.6	53.5	40.0	9.2	40.1
18	S	酵素法	25.7	50.1	39.6	9.8	40.0
19	T	ﾌｨｽｹ･ｻﾊﾞﾛｰ法	24.5	46.6	37.3	9.3	37.9
20	U	ﾌﾟﾘﾝﾇｸﾚｵﾁﾄﾞﾎｽﾎﾘﾗｰｾﾞ･ｷｻﾝﾁﾝｵｷｼﾀﾞｰｾﾞ	25.6	50.9	38.4	9.5	41.9
21	V		24.9	49.5	70.6	11.9	43.3
		最小値	24.5	46.6	36.9	9.1	37.6
		最大値	28.3	56.0	70.6	11.9	44.0
		平均値	25.7	51.1	41.1	9.6	40.4
		標準偏差	0.8	2.1	7.0	0.6	1.5
		C.V.%	3.3	4.1	17.1	5.8	3.6

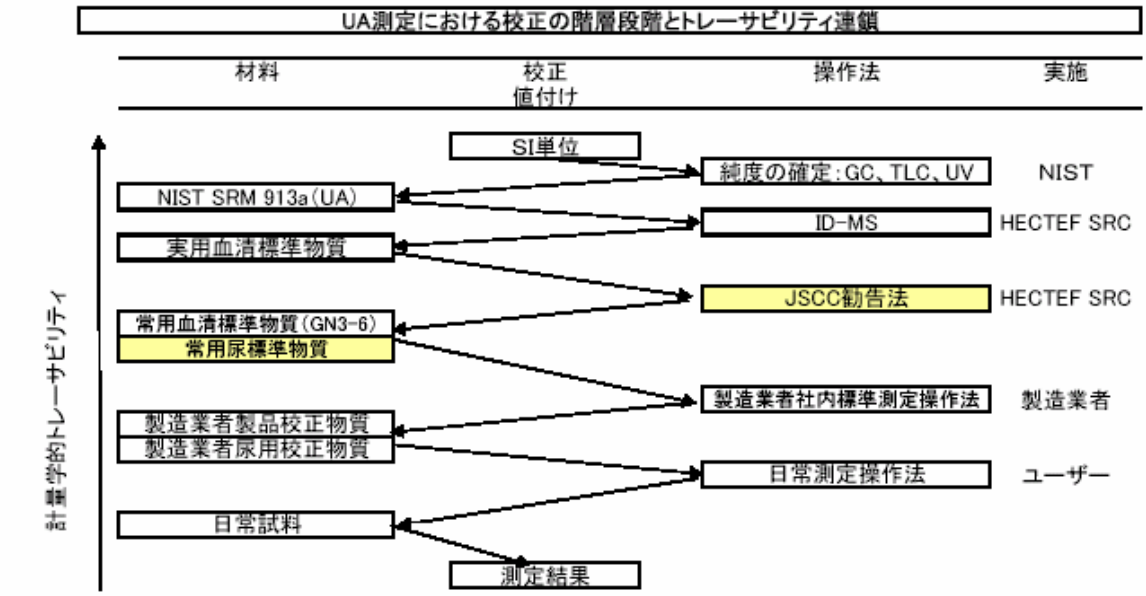

Ca測定における校正の階層段階とトレーサビリティ連鎖
材料
校正
値付け
操作法
実施
計量学的トレーサビリティ
SI単位
純度の確定:クーロメトリ、TG,AAS
NIST
NIST SRM 915a(CaCO3)
ID-MS
NIST
NIST SRM 909b
原子吸光光度法
HECTEF SRC
常用血清標準物質(CA-6)
常用尿標準物質
製造業者社内標準測定操作法
製造業者
製造業者製品校正物質
製造業者尿用校正物質
日常測定操作法
ユーザー
日常試料
測定結果

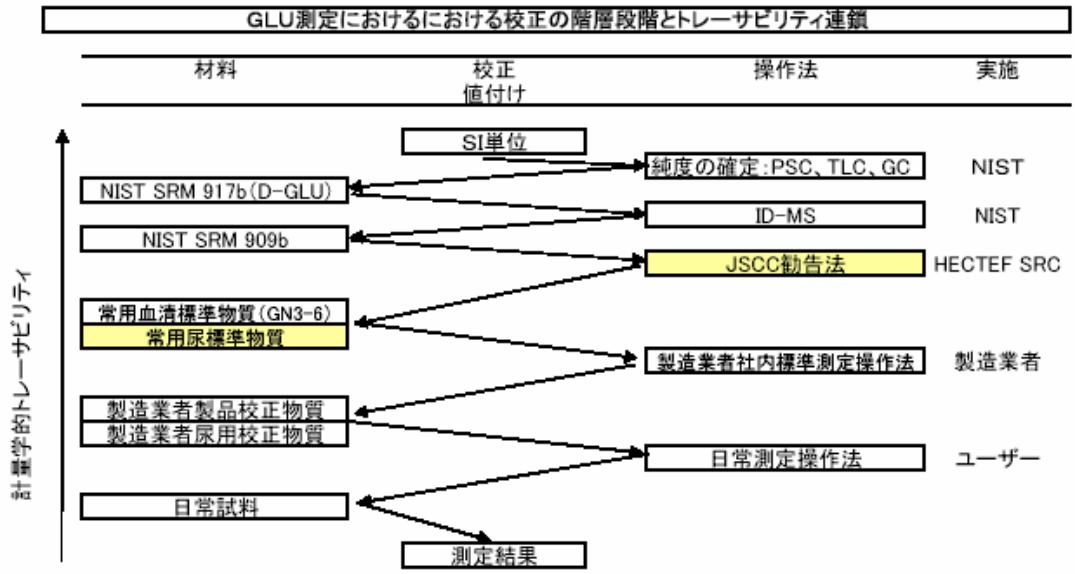

Mg測定における校正の階層段階とトレーサビリティ連鎖
材料
校正
値付け
操作法
実施
計量学的トレーサビリティ
SI単位
純度の確定:ID-MS
NIST
NIST SRM 929(Mg gluco)
ID-MS
NIST
NIST SRM 909b
原子吸光光度法
HECTEF SRC
常用血清標準物質(CA-6)
常用尿標準物質
製造業者社内標準測定操作法
製造業者
製造業者製品校正物質
製造業者尿用校正物質
日常測定操作法
ユーザー
日常試料
測定結果

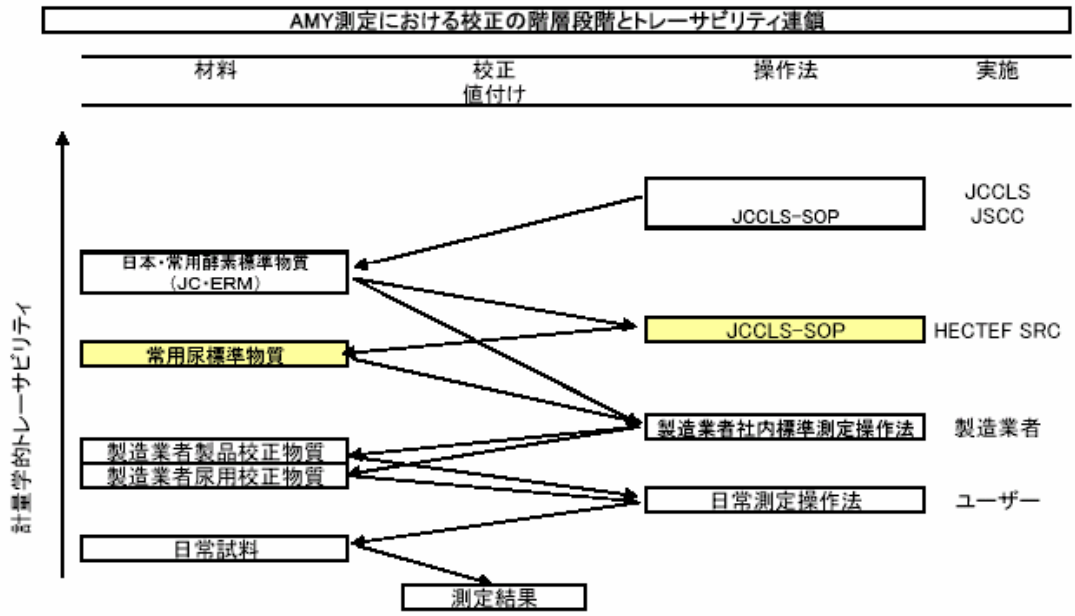

無機リン測定における校正の階層段階とトレーサビリティ連鎖
材料
校正
値付け
操作法
実施
計量学的トレーサビリティ
SI単位
純度の確定:
CERI
JIS K 9020 pH標準液用
(Na_2HPO_4)
イオンクロマトグラフィー
HECTEF SRC
常用血清標準物質
常用尿標準物質
製造業者社内標準測定操作法
製造業者
製造業者製品校正物質
製造業者尿用校正物質
日常測定操作法
ユーザー
日常試料
測定結果


UN測定における校正の階層段階とトレーサビリティ連鎖
材料
校正
値付け
操作法
実施
計量学的トレーサビリティ
SI単位
純度の確定:PSC、NMR
NIST
NIST SRM 912a(Urea)
ID-MS
NIST
NIST SRM 909b
AACC推奨法
HECTEF SRC
常用血清標準物質(GN3-6)
常用尿標準物質
製造業者社内標準測定操作法
製造業者
製造業者製品校正物質
製造業者尿用校正物質
日常測定操作法
ユーザー
日常試料
測定結果


CRE測定における校正の階層段階とトレーサビリティ連鎖
材料
校正
値付け
操作法
実施
計量学的トレーサビリティ
SI単位
NIST SRM 914a(CRE)
NIST SRM 909b
常用血清標準物質(GN3-6)
常用尿標準物質
製造業者製品校正物質
製造業者尿用校正物質
日常試料
測定結果
純度の確定:GC、PSA、TLC
ID-MS
JSCC勧告法
製造業者社内標準測定操作法
日常測定操作法
NIST
NIST
HECTEF SRC
製造業者
ユーザー


UA測定における校正の階層段階とトレーサビリティ連鎖
材料
校正
値付け
操作法
実施
計量学的トレーサビリティ
SI単位
NIST SRM 913a(UA)
実用血清標準物質
常用血清標準物質(GN3-6)
常用尿標準物質
製造業者製品校正物質
製造業者尿用校正物質
日常試料
測定結果
純度の確定:GC、TLC、UV
ID-MS
JSCC勧告法
製造業者社内標準測定操作法
日常測定操作法
NIST
HECTEF SRC
HECTEF SRC
製造業者
ユーザー


GLU測定におけるにおける校正の階層段階とトレーサビリティ連鎖
材料
校正
値付け
操作法
実施
計量学的トレーサビリティ
SI単位
純度の確定:PSC、TLC、GC
NIST
NIST SRM 917b(D-GLU)
ID-MS
NIST
NIST SRM 909b
JSCC勧告法
HECTEF SRC
常用血清標準物質(GN3-6)
常用尿標準物質
製造業者社内標準測定操作法
製造業者
製造業者製品校正物質
製造業者尿用校正物質
日常測定操作法
ユーザー
日常試料
測定結果


AMY測定における校正の階層段階とトレーサビリティ連鎖
材料
校正
値付け
操作法
実施
計量学的トレーサビリティ
JCCLS-SOP
JCCLS
JSCC
日本・常用酵素標準物質
(JC-ERM)
JCCLS-SOP
HECTEF SRC
常用尿標準物質
製造業者社内標準測定操作法
製造業者
製造業者製品校正物質
製造業者尿用校正物質
日常測定操作法
ユーザー
日常試料
測定結果

２－４－２－３　血清無機リン

要旨

１）血清無機リンについて、「実試料標準物質候補品を調製・使用し、市販キットのデータ収束性について検証を行う」ことを目的とした調査研究を実施した。

２）血清無機リンに関して調査した結果本邦にて入手可能な血清実試料標準物質は存在せず、各企業は NIST、JCSS 等の高純度標準物質を直近上位標準としたトレーサビリティ体系となっていることがわかった。

３）本年度は市販キットの互換性の調査及び実試料標準物質候補品を使用した予備試験により収束性を検討した。方法は各社の測定のプロトコルに従い患者血清 32 例を測定した。その際、実試料標準物質候補品も検体として測定し収束性を確認した。解析方法は各キット間の収束性を CV により検証した。また、各標準品の反応性を試薬キャリブレーターによる測定値として各キット間で比較した。

４）その結果、現行の状態で試薬間測定値の互換性は得られており、本実験で使用した標準候補品は各社キャリブレーターと同等の収束性を示した。さらに各試薬の測定原理を考慮する事で収束性は改善されると考えられた。今後の課題としては標準物質の濃度設定の検討が必要であり、また、測定原理により収束性が異なったため、標準物質候補品のマトリックスの検討が必要と思われる

なお、平成 18 年度は残る課題を解決して、実試料標準物質の作製作業を予定している。

１．目的

本調査研究項目群、C1（尿中電解質成分、尿中生化学成分、血清無機リン）内の血清無機リンについて、「血清無機リン用実試料標準物質候補品を調製・使用し、市販キットのデータの収束性について検証を行う」ことが本調査研究の目的である。

２．委員会の構成

	氏名	所属
責任者	小林　隆	栄研化学株式会社
運営管理者（臨薬協）	小林　隆	栄研化学株式会社
柱 1／C1 担当	中野　頼人	株式会社シノテスト
実行計画作成者	五来　隆	株式会社カイノス
技術アドバイザー	桑　克彦	筑波大学大学院　助教授
技術アドバイザー	森下　芳孝	三重大学病院中央検査部技師長
技術担当者	山下 章吾	アークレイマーケティング株式会社
技術担当者	樋渡 亮二	ｵｰｿ･ｸﾘﾆｶﾙ･ﾀﾞｲｱｸﾞﾉｽﾃｨｯｸｽ株式会社
技術担当者	谷口 嘉之	オリエンタル酵母工業株式会社
技術担当者	五来　隆	株式会社カイノス
技術担当者	大和　隆	協和メデックス株式会社
技術担当者	吉田 敏之	シスメックス株式会社
技術担当者	田中 龍彦	株式会社シノテスト
技術担当者	根占 哲也	株式会社セロテック
技術担当者	斉藤 憲祐	デイド　ベーリング株式会社
技術担当者	瓶子　隆	デンカ生研株式会社
技術担当者	須釜 裕司	日東紡績株式会社
技術担当者	牧内　肇	富士写真フィルム株式会社
技術担当者	横田 敦子	ベックマン・コールター株式会社
技術担当者	竹森 圭二	ミズホメディー株式会社
技術担当者	秋元 一隆	株式会社三菱化学ヤトロン
技術担当者	吉海　毅	ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
技術担当者	花田 寿郎	和光純薬工業株式会社
技術担当者	細井　健二	第一化学薬品株式会社
技術担当者	瀬川　充	関東化学株式会社
技術担当者	水口　克彦	東洋紡績株式会社
技術担当者	久米　俊久	極東製薬工業株式会社

３．委員会の開催

③ 第一回会合：2005/11/21（月）13：00～15：00　（臨薬協会議室）

④ 第二回会合：2006/4/12（水）10：00～12：00　（臨薬協会議室）

４．調査研究の概要

（1）測定値の互換性の現状

1）現状の調査

①市販されている標準物質

日本における血清無機リン実試料標準物質は存在しないことが確認できた。

②無機リン測定の実態調査

参加企業にアンケート調査を実施した結果、血清無機リンに関しては、その測定の多くは NIST 等の純物質系標準物質及び JCSS 標準品を直近上位標準としたトレーサビリティ体系となっていることがわかった。

2）現状把握の為の実験

尿中生化学における試薬間測定値の互換性に関するデータは無い為、市販キットの互換性の調査及び実試料標準物質を使用した収束性の検討の予備試験を以下の通り実施した。

⑤ 市販キャリブレーターによる収束性の現状

⑥ HECTEF SRC 製造の血清無機リン標準候補品（一種類・二濃度）による収束性の効果

⑦ 二濃度）による収束性の効果

方法は測定プロトコルに従い患者血清 32 例を測定した。その際、上記②に関しても検体として測定し収束性を確認した（以下、②を標準品と総称する）。

3）実験結果

市販キットの収束性をキット間 CV により検証した。また、各標準品の反応性を試薬キャリブレーターによる測定値として各キット間で比較した。

24 試薬の各標準品による 32 検体の平均収束性は 3.0～38.5%であり、血清無機リン標準候補品 Level 2 の収束性が大きかった（Ⅲ-1）。

血清無機リン測定法の主な測定原理である酵素法を採用している試薬（18 試薬）の平均収束性は 2.5～43.1%であり血清無機リン標準候補品 Level 2 の収束性はさらに広がった（Ⅲ-1）。

測定値が明らかにおかしかった T 社（Ⅳ-1）を除外した 23 試薬での平均収束性は 2.4～5.1%であり（Ⅲ-2）、酵素法のみ（17 試薬）でも平均収束性は 1.7～3.2%であり（Ⅲ-2）、いずれの測定原理でも各社キャリブレーターと血清無機リン標準物質候補品の収束性は同等となった。

4）今後の課題

本実験により血清無機リンにおける市販キットの互換性の調査及び実試料標準物質を使用した収束性が確認できた。

その結果、現行の状態で試薬間測定値の互換性は得られており、本実験で使用した標準物質候補品は各社キャリブレーターと同等の収束性を示した。さらに各試薬の測定原理を考慮する事で収束性は改善されると考えられる。今後の課題としては標準物質の濃度設定の検討が必要であり、また、測定原理により収束性が異なったため、標準物質候補品のマトリックスの検討が必要と思われる。

（2）標準化および標準物質の設定経過

（1）の結果に基づき、血清無機リン候補品により各社のキャリブレーターと同等の収束効果を確認した為、血清無機リン候補品を標準物質にすべく次のステップへ進むこととした。

（3）標準物質の設定

血清無機リン候補品をベースとして今後設定する。

（4）値付けの測定方法の選択

今回の候補品の値付けの方法は HECTEF SRC に一任した。HECTEF SRC が行なった方法は以下の通りである。

項目	較正物質	測定方法
IP	SRM200a	イオンクロマトグラフィー

５．標準物質の作製プロトコル

（1）トレーサビリティシステム

SI 単位系を最上位に位置づける体系とした。

（2）性状規格

今後設定する。

（3）基準測定操作法（可能な場合）又は共同実験

５.（4）の測定法の検証を含めて今後設定する。

（4）値付けの手順

今後設定する。

（5）認証値と不確かさ（共同実験の場合は ISO ガイド 35 に従う。その他 GUM による）

今後設定する。

６．今後の課題

平成 18 年度は、これまでの結果を基に実試料標準物質候補品作製のための本格的な作業を行う。主な作業としてはマトリックス、設定濃度、設定本数の検討であり、実試料標準物質候補品での収束性及び反応性の再検証の確認をした後に作製作業を行う。

７．結び

平成 17 年度の研究において、血清無機リンの実試料標準物質候補品の作成を行い、かつシミュレーションによるプレ検証試験も行い、その有用性について確認した。平成 18 年度は残る課題を解決して、実試料標準物質の作製作業を予定している。

JCCLS C1 WG

収束性　まとめ

Ⅲ−1　血清無機リン（補正無し）

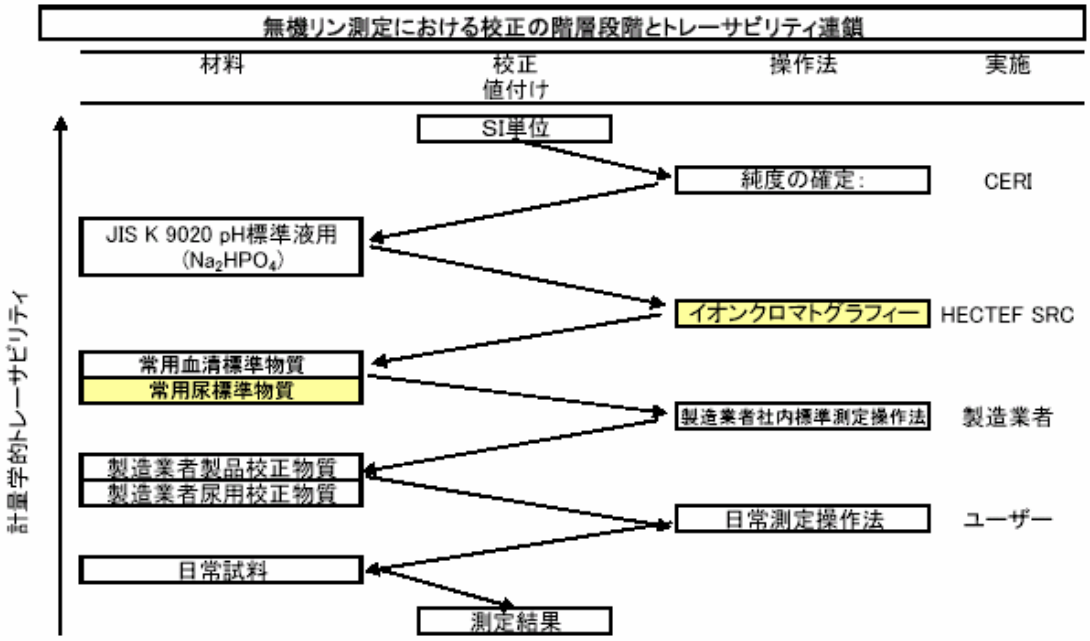
	全体			酵素法		
	最小値	最大値	平均	最小値	最大値	平均
試薬ｷｬﾘﾌﾞﾚｰﾀｰ	4.0	11.0	5.6	2.4	12.3	4.0
血清無機リン標準候補品Level 1	1.5	11.2	3.0	1.1	12.8	2.5
血清無機リン標準候補品Level 2	9.8	42.2	38.5	11.2	47.2	43.1

Ⅲ−2　血清無機リン（補正有）

	全体			酵素法		
	最小値	最大値	平均	最小値	最大値	平均
試薬ｷｬﾘﾌﾞﾚｰﾀｰ	3.6	8.7	5.1	2.2	5.9	3.2
血清無機リン標準候補品Level 1	1.5	5.8	2.4	1.1	3.9	1.7
血清無機リン標準候補品Level 2	2.2	7.6	3.8	1.5	5.1	2.5

Ⅳ-1 血清無機リン(IP)

	試薬メーカー	測定原理	Aalto Level1	Aalto CRP Ⅱ	血清無機りん標準物質 Level1	血清無機りん標準物質 Level2
			3.4	8	3.7	9.7
1	A	ﾓﾘﾌﾞﾃﾞﾝ ﾌﾞﾙｰ法	3.53	7.80	3.53	9.57
2	B	ﾄﾞﾗｲｹﾐｽﾄﾘｰ法	3.60	8.87	3.70	10.17
3	C	PNP-XDH法	3.53	8.13	3.40	9.57
4		MPL法	3.50	8.00	3.33	9.40
5	D	酵素法	3.50	8.23	3.50	9.90
6		酵素法	3.50	8.03	3.40	9.63
7	E	酵素法	3.60	8.27	3.50	10.10
8	F	酵素法	3.41	7.93	3.35	9.58
9	G	酵素比色法(PNP-XOD-POD系)	3.43	7.89	3.41	9.62
10		酵素比色法(PNP-XOD-POD系)	3.42	7.90	3.38	9.53
11	H	ﾓﾘﾌﾞﾃﾞﾝ酸UV法	2.47	5.20	2.90	9.20
12	I	酵素法	3.60	8.33	3.60	10.03
13	J	酵素法	3.40	7.97	3.40	9.60
14	K	PNP･XOD･POD法	3.83	8.60	3.37	10.33
15	L	ﾓﾘﾌﾞﾃﾞﾝ酸UV法	3.60	8.67	3.43	9.57
16			3.47	8.67	3.53	9.63
17	M	酵素法	3.40	7.83	3.40	9.53
18	N	酵素法	3.53	8.20	3.60	9.90
19	O		3.38	7.79	3.31	9.31
20	P	PNP･XDH法	3.50	7.97	3.40	9.60
21	Q	ﾌｨｽｹ･ｻﾊﾞﾛｰ法	3.26	7.95	3.50	9.65
22	R	ﾌﾟﾘﾝﾇｸﾚｵﾁﾄﾞﾎｽﾎﾘﾗｰｾﾞ･ｷｻﾝﾁﾝｵｷｼﾀﾞｰｾﾞ	3.40	7.70	3.33	9.30
23	S	酵素法	3.53	8.17	3.43	9.70
24	T		3.63	3.90	3.60	3.27
		最小値	2.47	3.90	2.90	3.27
		最大値	3.83	8.87	3.70	10.33
		平均値	3.46	7.83	3.43	9.40
		標準偏差	0.24	1.07	0.15	1.34
		C.V.%	6.9	13.7	4.4	14.2


無機リン測定における校正の階層段階とトレーサビリティ連鎖
材料
校正
値付け
操作法
実施
計量学的トレーサビリティ
SI単位
純度の確定:
CERI
JIS K 9020 pH標準液用
(Na_2HPO_4)
イオンクロマトグラフィー
HECTEF SRC
常用血清標準物質
常用尿標準物質
製造業者社内標準測定操作法
製造業者
製造業者製品校正物質
製造業者尿用校正物質
日常測定操作法
ユーザー
日常試料
測定結果

２－４－２－４　血清前立腺特異抗原（PSA）

要旨

１）血清中の前立腺特異抗原（PSA）測定のための標準化について検討した。

２）標準化に必要な測定法の条件としては、遊離型(Free PSA)と複合型(PSA-ACT)に等しい反応性を示す等モル反応系であることとした。

３）トレーサビリティ連鎖の頂点は、WHO の PSA 標準品複合型(PSA-ACT：遊離型(Free PSA)＝90：10)とする。これにトレーサブルな標準物質は、buffer 系と血清系が存在するが、等モル反応系の日常検査法においては、緩衝液系で測定値の互換性が得られた。

４）血清系の標準物質については、アルカリ処理のベース血清系を設定した。しかし等モル反応系の日常検査法においては、メーカーの基準としての標準物質として積極的な必要性が無かったが、日常検査法の測定値の内部精度管理用の試料や外部精度評価用の試料には有用であるとされた。

１．目的

本検査項目は、中高年以降の男性に多発し我が国においても増加している前立腺がんの有用なマーカーであり、がんの早期発見や診断、治療経過の観察や予後の推定等に使用されている。

血清前立腺特異抗原（PSA）測定の検査試薬間差に関しましては、90 年代の後半から、PSA 検査が普及するにつれて問題が表面化してきた。このため、日本泌尿器科学会と日本臨床病理学会が「血清 PSA 測定に関する調査研究委員会」を発足させて、方法間差の現状とその要因の解明を目的に、解析的なサーベイを実施した。その結果、1997 年に 22 社 28 種類の検査試薬が参加して行ったサーベイでは、半数の 14 の検査試薬に著しい反応の偏り（遊離型 PSA と複合型 PSA に対する免疫反応性の差異）があり、これが測定値差の主たる原因となっていることが明らかになった。

この調査研究の報告を受けて、検査試薬メーカーでの試薬の等モル反応性への改良・開発が行われた。その結果、3 年後の 2000 年に日本泌尿器科学会の「PSA ad hoc 委員会」が実施したサーベイでは、参加した 18 社 26 種類の検査試薬中、著しい偏り反応を呈したのはわずかに 4 種類に減少するなど、大きな改善が見られた。

一方、標準化を達成するためには、この反応の偏りの是正とともに、各企業が使用する校正用標準物質の値付けを上位の標準物質から伝達するトレーサビリティ体系の確立が必要である。

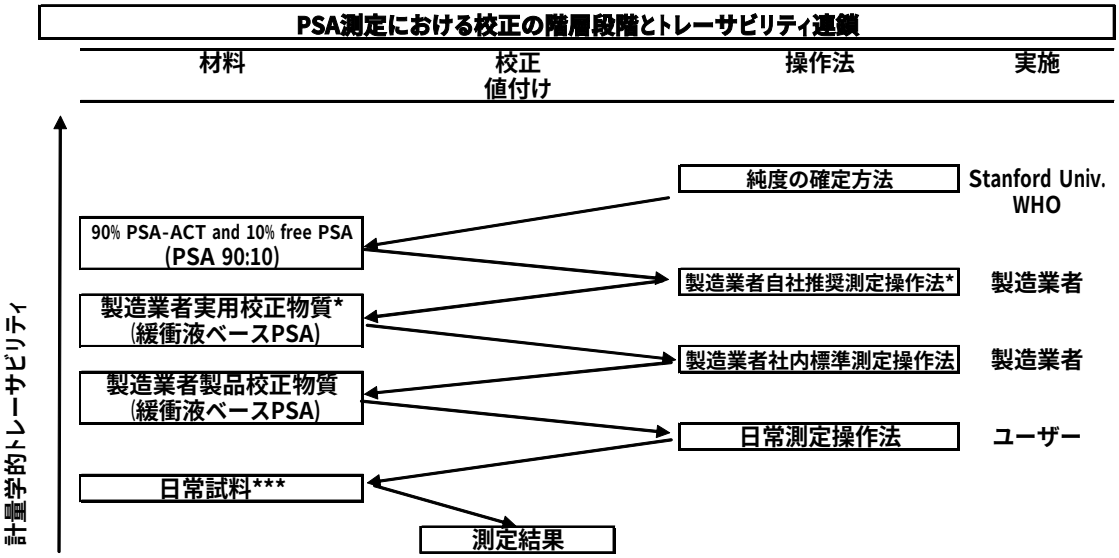
この一次標準物質の確立は、PSA の標準化を進める上で重要な第一歩ではあるが、しかし、マトリックスが実試料の血清とは異なるものである。各企業の校正用標準物質の値付けを行うためには、この一次標準物質にトレーサブルで、血清と同じマトリックスを有する二次標準物資を導入した基準測定体系の確立が必要である。

そこで、そのような条件を備えた血清ベース二次標準物質の作製と、その値付けのために必要な基準測定操作法の備えるべき条件につき検討した。そして、諸種検討の結果、血清ベース標準物質の一つの候補となるものを作製することができたので、それを用いることが試薬間差の解消に寄与するか否かについて、各試薬メーカーの協力を得た共同実験を行った。

２．測定体系と緩衝液ベース標準物質

血清 PSA の標準物質については、米国 NCCLS が提唱した作製法により得られる標品を WHO が 1999 年に国際生物学的標準物質として認証したことで、一次標準物質が確立した。すなわち、精漿から生化学的純度で精製され、アミノ酸分析にて値付けされた PSA が、遊離型(Free PSA)と複合型(PSA-ACT)の二つの分子形態の標準物質として供給されるようになった。

最終的に設定された測定体系を以下に示した。



*freePSAとPSA-ACTの両分子を同等にとらえる等モル反応(equimolar response)系
緩衝液系と血清系に対して等マトリックス反応を示す系
**調整方法は製造業者実用校正物質調整プロトコルによる
***EQA用試料：アルカリ処理ベース血清PSA(HECTEF SRC)

３．血清系標準物質

上記の測定体系となった経過においては、緩衝液ベースの標準物質の確立は、PSA の標準化を進める上で重要な第一歩ではあるが、しかし、マトリックスが実試料の血清とは異なるものである。各企業の校正用標準物質の値付けを行うためには、この緩衝液ベースの標準物質にトレーサブルで、血清と同じマトリックスを有する実試料標準物質を導入した基準測定体系の確立が必要である。

そこで、そのような条件を備えた血清ベースの標準物質の作製と、その値付けのために必要な基準測定操作法の備えるべき条件につき検討した。そして、諸種検討の結果、血清ベース標準物質の一つの候補となるものを作製することができたので、それを用いることが試薬間差の解消に寄与するか否かについて、各試薬メーカーの協力を得た共同実験を行った。

精製 PSA には、プロテアーゼの活性を有する活性型 PSA が 6 割以上存在し、これをそのまま血清（PSA ゼロ濃度の女性血清を使用）に添加すると、血清中のα2-マクログロブリン(AMG)によって捕捉され、PSA としての免疫活性を失ってしまう。そこで、血清中の AMG を不活化するアルカリ処理の方法について、いろいろな条件検討を行い、その結果、pH11.0、37℃、４時間の処理が、AMG を不活化し、他の蛋白質の変性を最小限にとどめる条件として選択することができた。

次に、このような処理で得られたベース血清に一次標準物質の PSA を添加して得られた標品を候補として、それを校正に使用した場合と、緩衝液系を使用した場合で、データの収束性に差が出るか否かにつき、19 社 30 種類の検査試薬の参加を得て共同実験を行った。その結果、この候補品による校正が有効であったのは、第一世代の ELISA を原理とする 1 種類のキットのみで、残りの他の試薬の大多数では両校正系で基本的に差はなく、良好な収束性を示すものであった。

この検討を通じて多くの知見が得られたが、今回作製した血清ベースの実試料系標準物質を共通の標準物質として値を伝達する場合と緩衝液系を使用する場合とでは、検査試薬間の測定値差に有意差が見られず、この実試料系の標準物質は、精度管理のモニター試料に有用であるとされた。

２－４－２－５　血清抗核抗体

要旨

１）膠原病或いは自己免疫疾患の診療には古くからスクリーニング検査或いはモニタリング検査として、抗核抗体検査が行われており、現在ではヒト喉頭癌由来細胞株 HEp-2 細胞を基質とした間接蛍光抗体法が標準的な方法となっている。

２）しかしながら、蛍光抗体法の判定は使用する蛍光顕微鏡の検出感度の影響を受けること、術者の個人差の影響を受けることから、測定結果にばらつきが生じている。また、抗核抗体検査の陽陰性の判定基準（カットオフ値）は、施設間で統一されていないことから、診療に混乱を招いている。

３）ある測定値（抗体力価）を持った患者血清を標準品として測定を行うことにより、施設間、術者間、装置間の差を改善できることが報告されている。

４）本研究では、標準品を定めることによる標準化の効果の確認の手順を検討し、実施計画を立てた。また、ISO ガイドに沿った標準品及び標準法の設定の可能性と限界を検討した。

１．はじめに

膠原病はその多くが難病に指定されている難治性慢性疾患である。その診療には古くから自己の成分（自己抗体）に対する抗体（自己抗体）の検出が行われてきており、診断基準等の項目として臨床判断に用いられている。C3-WG は、自己抗体のスクリーニング検査或いはモニタリング検査として、広く臨床に使用されている抗核抗体検査及び RA（関節リウマチ）のスクリーニング検査或いはモニタリング検査として、広く臨床に使用されている RF（リウマトイド因子）の標準化に関する調査研究を目的として発足された。今年度は、抗核抗体に関する調査研究の結果を報告する。

抗核抗体検査は、近年の細胞培養技術の進歩により、現在はヒト喉頭癌由来細胞株 HEp-2 細胞を基質とした間接蛍光抗体法が標準的な方法となっている。しかしながら、蛍光抗体法の判定は使用する蛍光顕微鏡の検出感度の影響を受けること、術者の個人差の影響を受けることから、測定結果にばらつきが生じている。また、抗核抗体検査の実施施設により陽陰性の判定基準（カットオフ値）が異なるため、施設間で判定の差が生じている。現在、間接蛍光抗体法による抗核抗体検査には適切な標準品が存在しておらず、このことが前述の問題に繋がっていると考えられる。

一方、ある測定値（抗体力価）を持った患者血清を標準品として測定を行うことにより、施設間、術者間、装置間の差を改善できることが、厚生労働省科学研究「自己免疫検査の効率的利用法の研究」(2005 年、主任研究者：神戸大学大学院医学系研究科　臨床病態・免疫学　熊谷俊一教授)、抗核抗体精度管理報告（(株）医学生物学研究所）で報告されている。

２．目的

抗核抗体測定のための標準品を定めることによる標準化の効果の確認と標準品作製および標準法の設定

３．委員会の構成

責任者：

新井 次郎	医学生物研究所	学術部

委員：

新井 次郎	医学生物研究所	学術部
藤本 栄樹	エイアンドティー	機器試薬ユニット開発グループ
小林　隆	栄研化学	マーケティング統括部
倉持 啓一	エスアールエル	品質管理課
樋渡 亮二	ｵｰｿ・ｸﾘﾆｶﾙ・ﾀﾞｲｱｸﾞﾉｽﾃｨｯｸｽ	ﾃｸﾆｶﾙｻｰﾋﾞｽｾﾝﾀｰ
日向　隆	カイノス	学術部
北村　竜太郎	極東製薬工業	品質管理部
船越 國宏	シスメックス	学術部
根占 哲也	セロテック	研究所
斉藤 憲祐	ﾃﾞｲﾄﾞ　ﾍﾞｰﾘﾝｸﾞ	ﾏｰｹﾃｨﾝｸﾞ
鎌田 祥子	デンカ生研	臨床試薬部　CS 課
高橋 義孝	日水製薬	診断薬営業部
松坂 啓之	日東紡績	メディカル開発センター
波多野 裕通	日本凍結乾燥研究所	製造部
藤居　賢	日本ﾊﾞｲｵﾗｯﾄﾞﾗﾎﾞﾗﾄﾘｰｽﾞ	診断薬事業本部
佐伯 ひろみ	ﾍﾞｯｸﾏﾝ・ｺｰﾙﾀｰ	診断ｼｽﾃﾑ本部
三好 欣也	三菱化学ヤトロン	DPC・RIA 事業部
島村　朗	三菱化学ヤトロン	LPIA 事業部

アドバイザー

熊谷 俊一	神戸大学	大学院医学系研究科
小柴 賢洋	兵庫医科大学	臨床検査医学
桑 克彦	筑波大学	大学院人間総合科学研究科
森下 芳孝	三重大学	医学部附属病院中央検査部

運営管理者

山本 茂一	カイノス	研究所

JCCLS 柱１担当者

佐藤 悦子	三菱化学ヤトロン	薬事部

４．委員会の開催

第一回：平成 17 年 11 月 7 日

第二回：平成 17 年 12 月 7 日

第三回：平成 18 年 1 月 17 日

第四回：平成 18 年 3 月 10 日

５．調査研究の概要

（１） 測定値の互換性の現状

・ 現行の試薬は、WHO 標準品（66/233）を校正物質としていない。

・ しかしながら、厚生労働省科学研究「自己免疫検査の効率的利用法の研究」（2005 年、主任研究者：神戸大学大学院医学系研究科　臨床病態・免疫学　熊谷俊一教授)、抗核抗体精度管理（(株）医学生物学研究所）にて、HEp-2 細胞を基質とした間接蛍光抗体法による抗核抗体検出試薬において、校正物質の効果が確認されている。

（２） 標準化および標準物質の設定経過

標準物質を使用した較正効果

抗核抗体は、ヒト血清由来の WHO 標準品（66/233）が存在している。

また、HEPASERA-1（(株）医学生物学研究所）を用いることによる測定結果の収束効果が確認されている。

校正物質として、下記の候補品が考えられる。

① WHO 標準品（66/233）を使用した校正効果

既存する WHO 標準品（66/233）を抗核抗体の校正物質候補品とし、測定値を較正すれば試薬間測定値の互換性が得られると考える。

しかしながら、WHO 標準品（66/233）の表示濃度 100IU/ml は、日常の抗核抗体の単位としては使用されていない。

臨床現場で使用する為には、希釈倍数による力価単位を決定することが必要となる。

② HEPASERA-1 を使用した校正効果

厚生労働省科学研究「自己免疫検査の効率的利用法の研究」（2005 年、主任研究者：神戸大学大学院医学系研究科　臨床病態・免疫学　熊谷俊一教授)、抗核抗体精度管理（(株）医学生物学研究所）にて、HEPASERA-1 を使用した校正効果が確認されている。また、血清中の抗核抗体と HEPASERA-1 のマトリクスは同じである。

抗核抗体の標準化のプロトコル

① 公的標準品

・ 本来、WHO 標準品（66/233）を公的標準品とするべきであるが、日常使用されている単位である希釈倍数力価の表示がない。

・ このため、今回は国内標準候補品との関係を明らかにしておくこととする。

② 国内公的標準候補品（ヒト血清ベース）

・ HEPASERA-1（(株）医学生物学研究所）とする。

③ 評価用実検体の準備

・ 患者検体（個人検体、血清）を入手（n = 50)。

防腐剤無し検体を集め、遠心し小分けする。

- 検体は 50 例程度とし、代表的な自己抗体を概ね均等に含む検体群とする。
- また、濃度分布に関しては概ね 2560 倍以下に 3%BSA-PBS にて希釈調整する。
- 集められた検体は、均一に混合した後、小分け分注し、保冷して各参加メーカーに配布する。（翌日午前着指定）
- 測定は各社で検体到着後 1 週間以内に測定完了する。

④ 各社ｷｯﾄでの測定

- WHO 標準品（66/233）、国内公的標準候補品及び各社の校正法を用いて較正する系（ルーチン法）の 3 系列で以下の試料を測定する。
- 2 系列で同時測定し、換算値データを提出する。
  （データは添付する Excell ファイルに入力後、提出。）
- 標準液は 2 重、測定試料は 2 重で測定する。
- 測定条件は各社試薬の設定に合わせる。
- 検体は 20 倍希釈から倍々希釈にて 2560 倍まで行い、定量値を報告する。
- 顕微鏡は、下記条件の物を用いる。
  オリンパス BX60　落射、WIB 励起、ND25　及び同等条件
  （オリンパス BH2-RFK　落射、B 励起、補助励起 EY455 など）

⑤ 結果集計

- WHO 標準品（66/233）にて校正する系を比較対照法（x 軸）として、国内公的標準候補品で較正する系及び各社キャリブレーターを用いて較正する系（y 軸）を評価する。
- 判定基準は体外診断用医薬品の適合性認証基準とする。
  （統計処理を行ったときの相関係数 0.9 以上、かつ、回帰直線式の傾きは 0.9～1.1）

（３）　標準物質の設定

１）標準物質の設定

- ５の（２）項の検討にて校正の効果が確認された場合、国内公的標準候補品を国内標準物質とする。

２）WHO 標準品（66/233）及び国内公的標準候補品の関係の確認

- WHO 標準品（66/233）及び国内公的標準候補品を各 3 重測定、5 日間測定する。
- WHO 標準品（66/233）及び国内公的標準候補品は 20 倍希釈から倍々希釈で測定し、定量値を報告する。
- 測定条件は試薬の設定に合わせる。
- 希釈から倍々希釈にて 2560 倍まで行い、定量値を報告する。
- 顕微鏡は、下記条件の物を用いる。
  オリンパス BX60　落射、WIB 励起、ND25　及び同等条件
  （オリンパス BH2-RFK　落射、B 励起、補助励起 EY455 など）

（4） 値付けの測定方法の選択

- 現在、抗核抗体検査は、Hep-2 細胞を基質とした間接蛍光抗体法、ELISA 法、LE テストが行われている。
- しかしながら、Hep-2 細胞を基質とした間接蛍光抗体法以外の方法は、抗原性が異なり、検出している自己抗体が異なる。
- したがって、値付けの測定方法は、Hep-2 細胞を基質とした間接蛍光抗体法とする。

6．標準物質の作製プロトコル

（1）トレーサビリティシステム

測定値が倍々希釈による抗体力価であり、不連続なため、そのようなシステムが妥当であるか、検討中である。

（2）性状規格

測定対象が、自己抗体であることから対応するエピトープ、抗体の結合力などが多様であることが判っている。抗核抗体検出のための妥当な性状について、検討中である。

（3）基準測定操作法又は共同実験

共同実験の計画を立案予定である。

（4）値付けの手順

共同実験による値付け手順を立案予定である。

（5）認証値と不確かさ（ISO Guide35）

共同実験により値付けを行うが、不確かさについては測定値が不連続な数値であることから、検討が必要である。

7．今後の課題

- 標準物質を定めることによる標準化の効果の確認
- ISO ガイドに沿った標準物質及び標準法の設定と限界の明確化。

8．結び

標準物質を定めることによる標準化の効果の確認の手順を検討し、実施計画を立てた。また、ISO ガイドに沿った標準物質及び標準法の設定の可能性と限界を検討した。

今後、標準化の効果を確認し、標準物質の設定と値の認証方法の検討、実施を行う予定である。

２－４－２－６　血清リチウム（Li）

要旨

１）現状

①開始時点での確認

・国内各種サーベイランスの対象になっていないことから、具体的な互換性について認識がない。通常測定法には、炎光法（フレーム法）、原子吸光法、電極法、色素法があるが、その互換性に関して、まとまった調査結果が存在しない。

・イオン電極法に関してのみ、HECTEF SRC よりリチウム一次標準血清が供給されていたが、現在は品切れ状態となっている

②実試料標準物質候補品

・NIST　SRM924a をヒト血清ベースに添加して、4 水準を調製し、冷凍品とした。

・各社に配布し、同時にリチウム添加ヒト血清を測定、標準化可能か検討した。

③結果

・測定法により、実試料標準物質候補品が測定範囲を超える場合があったが、測定範囲内のものを使用して補正を行った場合、各社キャリブレータを使用した場合より収束が認められ、有用性が確認できた。

２）今後の予定および問題点

・平成 17 年度の研究において、実試料標準物質候補品を用いて検証試験も行い、その有用性について検証した。

・平成 18 年度は、これまでの結果を基に実試料標準物質候補品調製のための本格的な作業を行う。実試料標準物質候補品での収束性の再検証の確認をした後に実試料標準物質とし、調製プロトコルの作業を行う。

・各社測定範囲と標準物質の濃度の関係、添加検体ではなく実試料での検討の必要性を明確にする。

１．目的

本調査研究項目群、C2（血清リチウム、血清総ビリルビン）内の血清リチウムにおいて、「血清リチウムの実試料標準物質候補品（将来的・国際的な公的標準品への架け橋）を調製し、それを用いて市販キットのデータ収束可能性について検証を行う」ことが目的である。

２．委員会の構成

【WG 名　C2（項目：血清総ビリルビン、血清リチウム）】

柱 1、C2 担当　中野　頼人（シノテスト）

運営管理者　水口　克彦（東洋紡）

アドバイザー（臨床）　なし

アドバイザー（技術）　桑　　克彦（筑波大学大学院人間科学総合研究科　助教授）

森下　芳孝（三重大学医学部附属病院中央検査部　技師長）

【技術担当者】

責任者（主に血清総ビリルビン）　高山　正治（アルフレッサ　ファーマ）

責任者（主に血清リチウム）　秋山　英時（常光）

山下　章吾（アークレイ）

小林　隆（栄研化学）

樋渡　亮二（オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス）

斉藤　憲祐（デイド　ベーリング）

須釜　裕司（日東紡績）

牧内　肇　（富士写真フィルム）

横田　敦子（ベックマン・コールター）

秋元　一隆（三菱化学ヤトロン）

吉海　毅　（ロシュ・ダイアグノスティックス）

花田　寿郎（和光純薬工業）

※上記のうち、血清リチウム担当者

責任者　秋山　英時（常光）

樋渡　亮二（オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス）

斉藤　憲祐（デイド　ベーリング）

横田　敦子（ベックマン・コールター）

吉海　毅　（ロシュ・ダイアグノスティックス）

３．委員会の開催

第 1 回会合　2005/11/15（火）13 : 00～16 : 00（臨床検査薬協会第２会議室）第 2 回会合　2005/12/19（金）13：00～16：00（同第２会議室）

第 3 回会合　2006/01/11（水）14：00～17：00（同第２会議室）

第 4 回会合　2006/02/22（水）14：00～17：00（同第１会議室）

第 5 回会合　2006/03/08（水）10：00～13：00（同第１会議室）

※※　初回のみ運営管理者（臨薬協・技術委員会。運営委員 JCCLS、臨薬協と WG 間の連絡調整役）が WG を召集、2 回目以降は運営責任者が開催。

４．調査研究の概要

（１）測定値の互換性の現状

血清リチウムに関しては、現在のところ国内各種サーベイランスの対象になっていないことから、具体的な互換性について認識されてこなかった（注１）。そのため、血清リチウムの通常測定法には、炎光法（フレーム法）、原子吸光法、電極法、色素法があるが、その互換性に関して、まとまった調査結果が存在しない。

なお、イオン電極法に関してのみ、HECTEF SRC（Health Care Technology Foundation, Standard Reference Center：HECTEF スタンダードレファレンスセンター）よりリチウム一次標準血清が供給されていたが、現在は品切れ状態となっている。

注１）血清リチウムを外部制度管理調査の対象としているもっとも有名な機関は CAP（College of American Pathologists）であり、アメリカをはじめ、カナダ、ヨーロッパ、日本を含むアジア諸国の診療機関や臨床検査センターが参加している。

（２）標準化および標準物質の設定経過

標準化および実試料標準物質候補品の設定は、以下の実施計画によって行った。

１）目的

NIST（National Institute of Standards and Technology：（米国）標準技術研究所）の公的標準 SRM 924a を購入し、血清リチウムの実試料標準物質候補品を調製し、**それ**を各社の測定システムで試料として測定することで、患者試料との反応性の違いの有無を確認する。反応性が同じ場合には、この候補品で検量線を作成した場合のシミュレーションを行い、市販キットのデータの収束可能性について検証を行う。本検討は血清リチウム測定用専用キットおよび測定用専用装置を対象とし、実試料標準物質候補品は HECTEF SRC から購入する。

２）手順

第１回会合後、ＷＧ参加メーカーを対象に実試料標準物質に望まれる性状、品質等の調査を行ったアンケートの結果、下記の内容で合意が得られた（アンケート表及び集計結果、別紙１）。

※ただし、その後生じた HECTEF SRC および JCCLS（Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards：特定非営利活動法人日本臨床検査標準協議会）の都合により、いくつかの修正を余儀なくされた。

⑥　リチウム実試料標準物質候補品

- NIST の公的標準 SRM 924a を購入し、HECTEF SRC が試料を調製、-70℃以下の凍結品として保存する。
- ベース：ヒト血清（プール）。
- 濃度及びポイント数：4 ポイント、約 0.5、約 1.0、約 1.5、約 2.0mmol/L
- 個数：各濃度×５本
- 容器および容量：容器 1.5mL バイアル、容量 5mL。
- 安定化剤：入れない。
- 安定性・保管方法：凍結品（-70℃以下）。開封後、半日。

- 各社における保存は、-70℃以下で行う。
- 値付け作業は HECTEF SRC が行う（調製に関わる詳細は、すべて開示させる）。
- 実試料標準物質候補品の値付け方法は HECTEF SRC に一任する。
- 同時に認証値および不確かさ（ISO GUM（注２））の開示も求める。
- トレーサビリティ体系図（案）は参照資料で後述。

⑦ 評価用実検体の準備

- JCCLS ではリチウムイオンが入った実検体（患者血清）を入手できないため、実検体はリチウムイオンを添加したプール血清で代用する（20～30 検体予定）。
- 濃度は約 0.4～2.0mmol/L 範囲となるようにし、調製は HECTEF SRC に依頼する。なお、この検体は以後、添加検体と表記する。
- 容量は 1.5mL×５本。
- 全 n 数は上記に市販コントロール各種（オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス、デイド　ベーリング、ベックマン・コールター、ロシュ・ダイアグノスティックスの複数種）を含めた数とする。
- 市販コントロールの測定は、測定法（色素法、電極法）による値のずれが生じるかどうか、それが血清よりも大きいかどうかなどを確認する目的で行う。

⑧ 各社キットまたは装置での測定

- 各社にて、自社の専用キットまたは専用装置にて測定。
- 校正および測定は各社で定めた標準法に従い、実試料標準物質候補品、各社キャリブレータ、添加検体、市販コントロールを、それぞれ検体として同時（連続）測定する。
- 測定回数　n = 3。
- その後、実試料標準物質候補品の表示値（HECTEF SRC が値付けしたもの）で、それぞれの検体を値付けし直した補正値で、収束結果を確認する（収束結果の計算には、市販の表計算ソフト（参加各社共通）を用いる）。

⑨ 結果集計（別紙３）

実試料標準物質候補品で補正した値を用いて、各社キャリブレータ、添加検体、各社コントロールで得られた結果を評価する。

注２）ISO GUM　International Organization for Standardization、Guide to the Expressing of Uncertainty in Measurements：国際標準化機構、計測における不確かさの表現のガイド

（3）標準物質の設定

上記、実施計画実施後、設定可能かどうか検証し、妥当性の確認が得られた場合に設定する。

（4）値付けの測定方法の選択

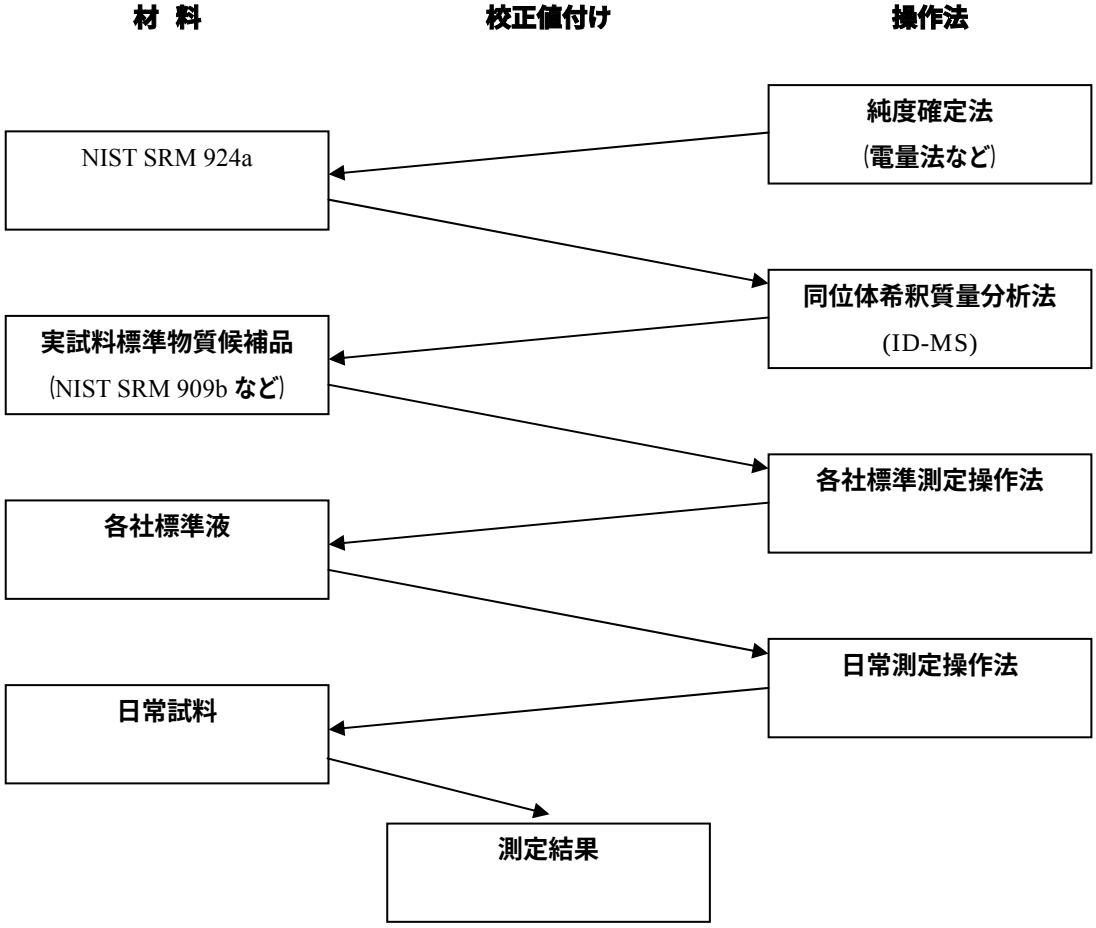
トレーサビリティ・チェーンの考え方からすると、公的標準品及び実試料標準物質候補品を値付けする方法は NIST SRM 909b と同じ同位体希釈質量分析法（ID-MS）が望ましく、各社標準液を値付けする方法は各社標準測定操作法、日常試料を値付けする方法は日常試料測定法が望ましい。

本 WG の場合、参加メーカーの実情から、各社標準測定操作法は、原子吸光法及び炎光法（フレーム法）に、日常測定法は、電極法及び色素法となるが、たとえば色素法では標準測定操作が入らないため、その測定は行われない。

５．標準物質の作製プロトコル

（１）トレーサビリティシステム

基準分析法である同位体希釈質量分析法により値付けされたイオン電極用リチウム一次標準血清(Lot.L91-1)を校正用標準物質として、実用基準分析法であるフレーム光度法で測定する事によりトレーサビリティを確保した。



※NIST SRM 909b は血清ベースだが、電極法には使えない。他には NIST SRM 956b（血清ベース、凍結品）などがある。

（２）性状規格

電解質及び共存イオン(Na, K, Cl, HCO_3^-)はいずれも基準範囲内のもの。

グルコースは基準範囲内のもの。

総タンパク、アルブミン、コレステロール、中性脂肪はいずれも基準範囲内のもの。

アンモニア性窒素　0.15mmol/L

アスコルビン酸　0.15ng/L 以下

感染性　HBs 抗原、HCV 抗体、HIV 抗原・抗体が不検出のもの

密度：1.024g/cm^3(25℃)

粘性率：1.6mPa・s(20℃)

水分量 0.928Kg/l(25℃)

pH 7.6(37℃)

（３）基準測定操作法（RMP)（あるいは測定方法）

校正用標準物質：イオン電極用リチウム一次標準血清（Lot L91-1）を校正用標準物質

測　定　方　法：フレーム光度法

（４）値付けの手順

基準分析法である同位体希釈質量分析法により値付けされたイオン電極用リチウム一次標準血清（Lot L91-1）を校正用標準物質として、実用基準分析法であるフレーム光度法で測定した。通常、測定回数は、5 重測定、6 セット行うが、本製品については、暫定的な表示値として報告したため 2 重測定、2 セットの結果である。

C1 及び C2 の血清総リチウム標準物質候補品の表示値は以下の通り。

注意）各表示値は反応性等の評価をするための暫定的な値であり、正確さの評価に使用することはできない。

血清総リチウム標準物質の表示値

	レベル１	レベル２	レベル３	レベル４	単位
総リチウム	0.50	1.00	1.50	2.00	mmol/L

（５）認証値と不確かさ（ISO GUM に従う）

（４）値付けの手順に従い求められた測定値の平均値を認証値（表示値）とした。不確かさについては、本製品については、暫定的な表示値として報告したので測定回数が少ないことにより表示していないが、通常は、ISO の指針（GUM：計測における不確かさの表のガイド）に従い求める。

６．今後の課題

平成 17 年度の研究において、実試料標準物質候補品を用いて検証試験も行い、その有用性について検証した。

平成 18 年度は、これまでの結果を基に実試料標準物質候補品作製のための本格的な作業を行う。実試料標準物質候補品での収束性の再検証の確認をした後に、実試料標準物質とし、作製のプロトコルの作業を行う。

７．結び

平成 17 年度の作業において、血清リチウム実試料標準物質候補品の選択を行い、その後の作業の方向性を定めた。平成 18 年度は残る課題を推し進め、実試料標準物質の作製プロトコルを完成させる。

＜添付資料＞

別紙１：データ解析結果報告

別紙２：トレーサビリティ・チェーン

別紙１：データ解析結果報告

データ解析結果報告

１．血清リチウム検証試験参加メーカー名および測定法

本検証試験に関し、参加メーカーは５社。そのうち色素法２社（内１社ドライケム)、電極法３社であった。

表１．血清リチウム集計結果（参加メーカー名、測定法など）

	担当メーカー	計測機器または試薬名称	各社標準品名称（ない場合は---）	測定日	測定法
1	A株式会社	電解質分析装置 希釈液 内部標準液	---（自社校正液1、2、3） コントロール（A）	2006/02/08	電極法
2	B株式会社	分析装置 試薬 リチウム試薬	標準液（B）	2006/02/14	色素法
3	C株式会社	電解質分析装置	---（自社校正液1、2）	2006/02/06-07	電極法
4	D株式会社	分析システム コントロールⅠ、Ⅱ	標準液１（D）	2006/02/06	色素法（ドライケム）
5	E株式会社	分堰装置	---（自社校正液1、2、3）	2006/02/13	電極法

※社名は仮名とし、アルファベットで示した。また各社のコントロール＆キャリブレータ名は仮名もした。

２．参加５社の測定結果（未補正）

以下に参加５社の測定結果を示す。

測定対象は、実試料標準物質候補品（4 濃度)、添加検体（30 濃度：健常プール血清に炭酸リチウム溶液を添加したもの。各社コントロール＆キャリブレータ（各濃度)。なお、３重測定の平均値を以後の集計に用いた。

※各社コントロール＆キャリブレータについては、測定法もしくは測定範囲との関係でそれぞれの社により測定不能のものもあった。

３．回帰式および補正係数

２項の参加５社の測定結果（未補正）　で得られた結果を元に、実試料標準物質候補品（以後、候補品と略記）で補正を行った場合の補正係数を計算した。補正の掛け方は全部で１４種類あるが、そのすべてについて実行した。

※表記の説明：補正の掛け方について以後、次のように表記する。

１）候補品 L（低濃度 0.50mmol/L）、M（中濃度 1.00mmol/L）、H（高濃度 1.50mmol/L）、A（アブノーマル：高高濃度 2.00mmol/L）を 1、2、3、4 と数値で表記する。これはアルファベットよりアラビア数字の方が直感的に判別し易いことによる。

２）例えば 1（候補品 L）、2（候補品 M）、3（候補品 H）、4（候補品 A）の４ポイントすべてを用いて補正を掛ける場合は「補正 1234」と、1（候補品 L）、2（候補品 M）、3（候補品 H）の３ポイントで補正する場合は「補正 123」と、1（候補品 L）、3（候補品 H）の２ポイントで補正する場合は「補正 13」というように表記する。

候補品の補正結果を以下に示す。

表２．候補品 1、2、3、4 で考えられる候補品のすべての補正結果

		表示値	平均値 未補正	補正値			
				1,2,3,4	1,2,3	1,2,4	2,3,4
実試料標準物質候補品･測定値	1	0.50	0.40	0.50	0.49	0.49	0.49
	2	1.00	0.96	1.02	1.02	1.01	1.01
	3	1.50	1.46	1.48	1.49	1.47	1.48
	4	2.00	2.05	2.00	2.05	2.00	2.00

		表示値	平均値 未補正	補正値					
				1,2	1,3	1,4	2,3	2,4	3,4
実試料標準物質候補品･測定値	1	0.50	0.40	0.50	0.50	0.50	0.44	0.47	0.52
	2	1.00	0.96	1.00	1.03	1.01	1.00	1.00	1.04
	3	1.50	1.46	1.45	1.50	1.47	1.50	1.47	1.50
	4	2.00	2.05	1.98	2.07	2.00	2.11	2.00	2.00

		表示値	平均値 未補正	補正値			
				1	2	3	4
実試料標準物質候補品･測定値	1	0.50	0.40	0.50	0.44	0.45	0.35
	2	1.00	0.96	1.06	1.00	1.01	0.91
	3	1.50	1.46	1.55	1.49	1.50	1.40
	4	2.00	2.05	2.15	2.09	2.08	2.00

※１点補正は当該候補品の表示値と５社平均値のずれを他の候補品に足して（引いて）実行

結果については、以後の章で合わせて述べる。

４．添加検体の補正結果

候補品４ポイントすべてを用いた補正（補正 1234）において、測定結果－５社平均値で相関を取ると、添加検体において参加５社の測定値が収束しないことがわかった。

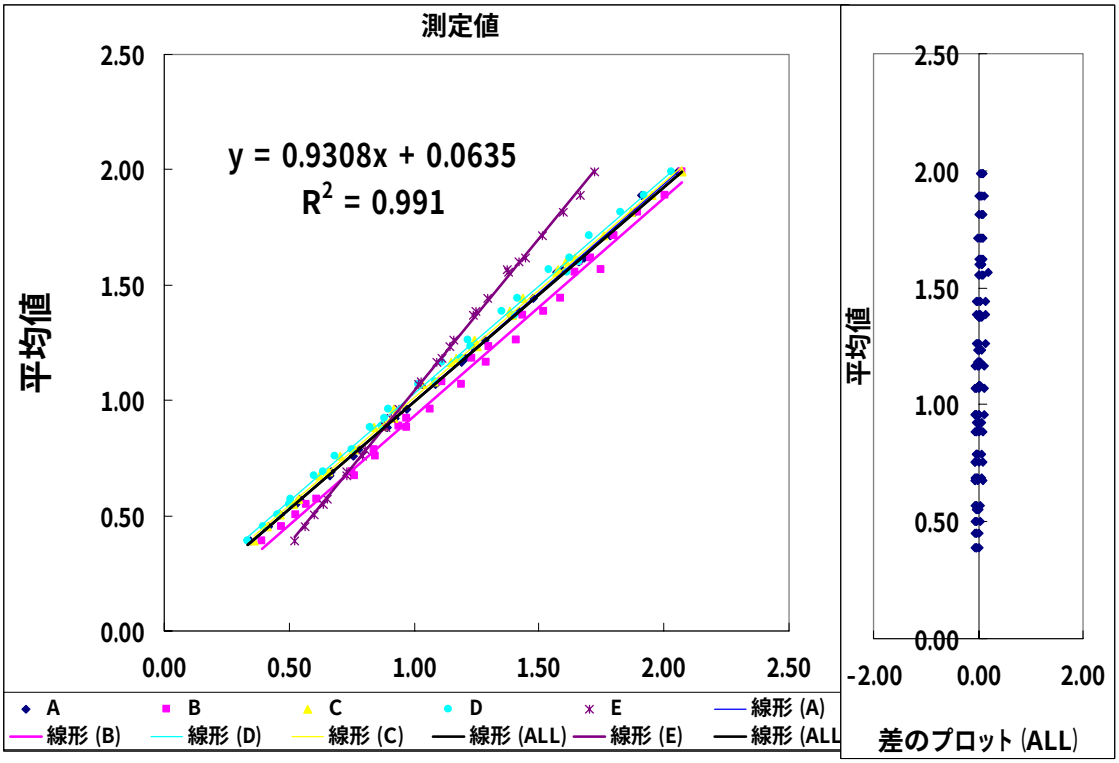


図１．候補品４ポイント（補正 1234）での補正結果における添加検体の収束性

これは参加１社（E 社）における候補品 4（2.0mmol/L）の未補正値 2.45mmol/L が補正 1234 による補正を掛けることにより 2.09mmol/L まで改善されるため（５社平均値では 2.05mmol/L）、逆に未補正で比較的値が一致していた添加検体（各添加検体の５社 CV に対する 30 濃度での平均値 5.69）でずれが生じてしまった結果と考えられる（同、補正 1234 の CV の平均値 7.57%）。

※表１．候補品 1、2、3、4 で考えられる候補品のすべての補正結果　参照。候補品 4 を用いない補正では、どの補正においても候補品 4 の値が表示値と乖離しているのがわかる。

上記を鑑み、候補品 4 を除いた３ポイントで測定データに補正を掛け、収束結果を見ることにした。

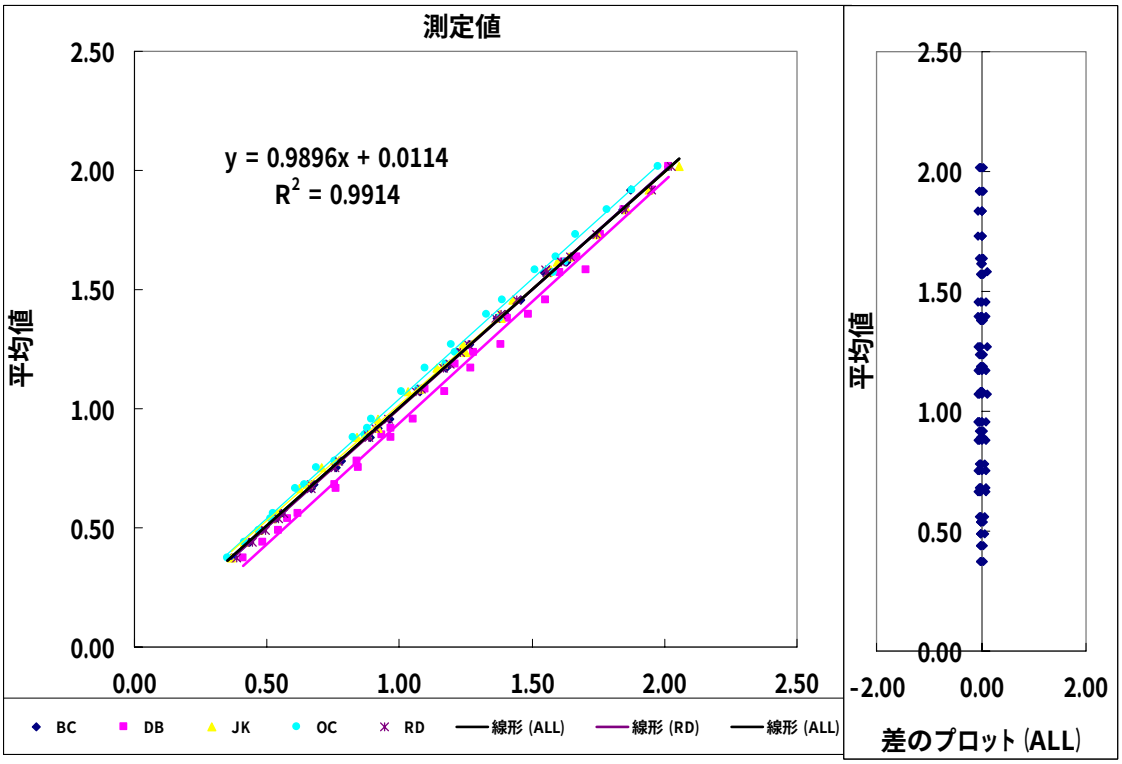


図２．候補品３ポイント（補正 123）での補正結果における添加検体の収束性

図２から明らかなように、添加検体の収束性は増大した。

参考として、補正 1234、補正 123 での「５社測定データー候補品表示値」の相関図を示す。

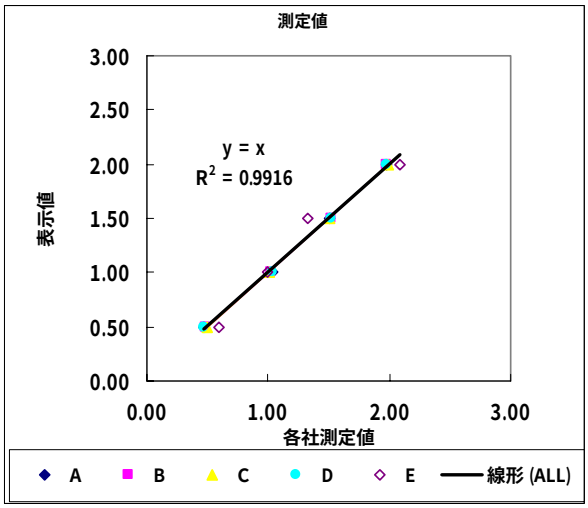


図３．補正 1234 での相関図

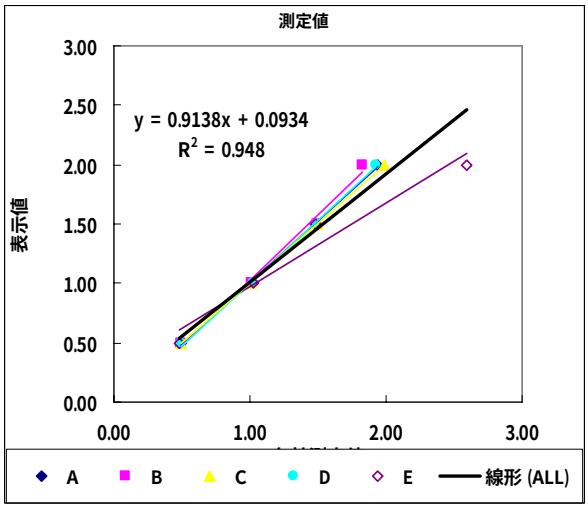


図４．補正 123 での相関図

図４から顕著に読み取れるように、E 社における候補品 4 の乖離（その１点のみ）が、他参加４社の収束性を妨害していたことがわかる。

５．すべての補正における各添加検体の５社変動係数（CV）および、それらの平均値

すべての補正における各添加検体の５社変動係数（CV）（５社それぞれの n=3 平均値、５値から求められた CV）およびそれら全 30 濃度の CV の平均値を求めた。

結果は、候補品 4 の１ポイントで補正したもので最も悪い（CV 34.86%）のは予想通りだったが、期待された候補品 123 で最も低くなることはなかった。これは添加検体においては、未補正の状態でも、ある程度収束性があるため（CV 5.69%）と思われる。

ちなみに、それぞれの補正で CV(%)が低かった順は、補正 13（3.90）、補正 123（4.14）、補正 12（4.53）、補正 1（5.25）、補正 3（5.46）、補正 23（5.63）、未補正（5.69）、補正 2（5.75）、補正 1234（7.57）、補正 124（8.20）、補正 14（8.72）、補正 24（10.32）、補正 234（11.78）、補正 34（19.50）、補正 4（CV 34.86）であった。

６．添加検体とコントロール＆キャリブレータおよび候補品との反応性の違い

コントロール＆キャリブレータ、および候補品を添加検体と同様に測定、計算処理したときの交差反応性を調べた。

補正の代表として補正 123 を選び、検討した。

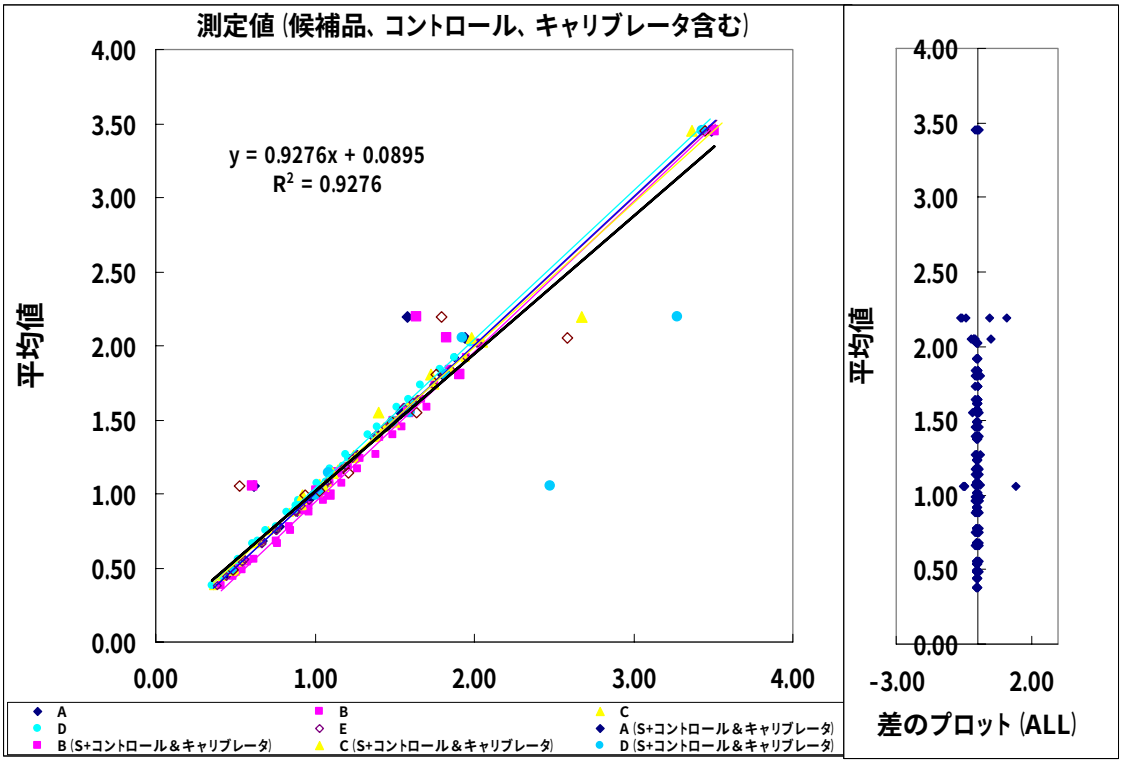


図５．補正 123 におけるコントロール＆キャリブレータおよび候補品の交差反応性

図５からわかるように、コントロール＆キャリブレータでは測定値と各社平均値との乖離が添加検体に比べて大きいことがわかった。これは、コントロール＆キャリブレータの場合、測定法による反応性の違い、測定範囲（高濃度、低濃度）、添加物、pH、マトリックスなどの影響が添加検体に比べて大きく現れた結果であると考えられる。

ちなみに最も値が乖離した検体は、５社平均値 1.06mmol/L に対し、2.48mmol/L であった（A 社のコントロール１（A）を D 社（色素法（ドライケム））で測定した場合）。

逆に、添加検体と反応性が類似していたのは、B 社の標準品（B）4 と D 社のコントロール I（D）であった。なお、これら２種のキャリブレータ＆コントロールは、次に述べる「測定値－５社の平均値または表示値」での相関においても、同じ挙動を示した。

さてここまでは、コントロール＆キャリブレータおよび候補品とも添加検体と同様に「測定値－５社平均値」での相関で結果を検討してきたが、コントロール＆キャリブレータの中には表示値（表示範囲もしくは代表値）が示されているものも存在する。そこで、表示値のあるものに対しては「測定値－表示値」（ないものは前者と同じ「測定値－５社平均値」）として相関を取ってみた。

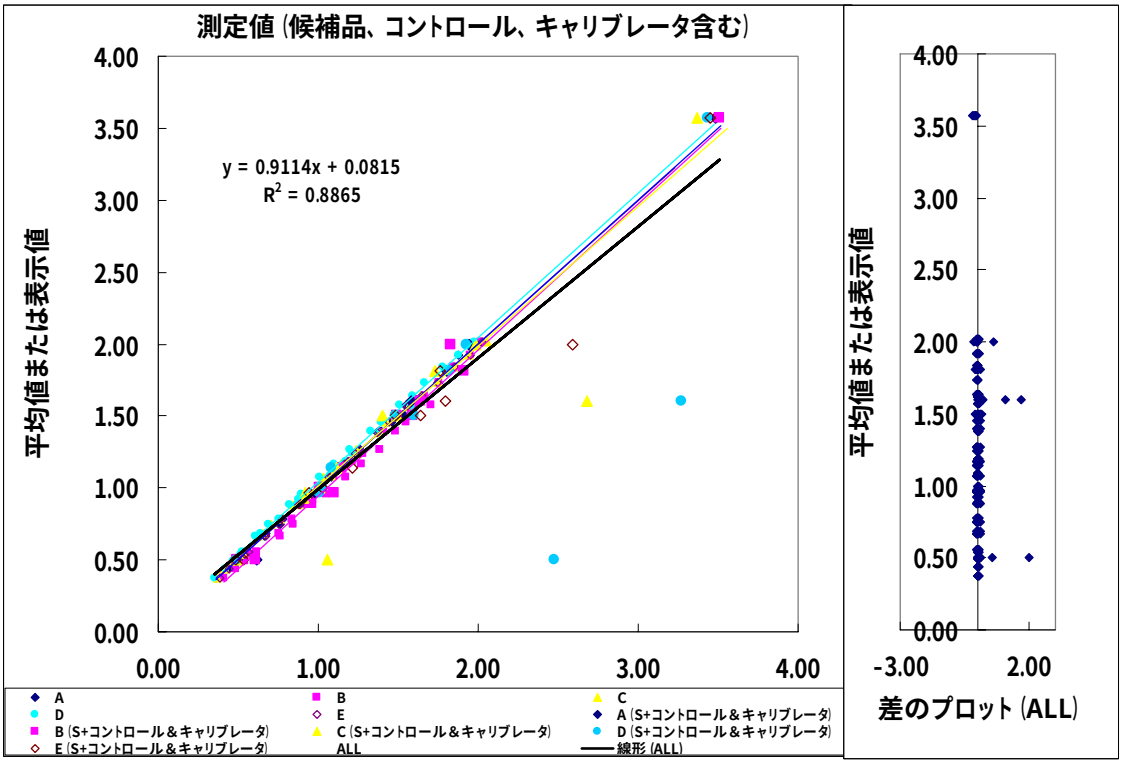


図６．候補 123 におけるコントロール＆キャリブレータ、および候補品の交差反応性

図６からわかるように、あるコントロール＆キャリブレータでは乖離の程度が小さくなり、別のコントロール＆キャリブレータでは乖離がより大きくなるという結果が得られた。また、平均値との相関では添加検体と挙動が類似していた検体で逆に乖離が大きくなってしまう場合も見られた（A 社のコントロール 1（A）を C 社（電極法）で測定した場合）。これは、平均値との相関では、他社での乖離の大きさに引き摺られて自社キットまたは装置で自社のコントロールまたはキャリブレータを測定したにも関わらず値が乖離してしまった検体の値が、本来の相関関係に戻ったためと考えられる（例えば、A 社、B 社）。逆に乖離が大きかったのは、自社キットまたは装置と他社のコントロールまたはキャリブレータを測定した場合であった（例えば A 社のコントロールまたはキャリブレータを C 社、D 社が測定した場合）。なお E 社においては、平均値または表示値との相関で A 社のコントロールまたはキャリブレータからの乖離が添加検体と同程度まで改善されているが、最初から外れていた候補品 4（表示値 2.00mmol/L、測定補正値 2.59mmol/L）では改善が認められなかった。

上記より、ある社のコントロールまたはキャリブレータを候補品として検討する余地も生じて

きた。今回の場合、当該品はB社の標準品（B）4とD社のコントロールI（D）であるが、前者は少量ではあるが防腐剤にチメロサール（水銀系防腐剤）が使用されているため法規制的に問題があり(ユーザがしかるべき廃棄をする必要がある)、後者はコントロールのため表示値がない(しかるべき測定法で値を求める必要がある）という問題点が挙げられる。

７．分類分けした場合のCV

反応性の違いから測定した全検体を同時に比較することはできない。そこで全検体を、候補品、添加検体、添加検体＋コントロール＆キャリブレータ、添加検体＋候補品、添加検体＋コントロール＆キャリブレータ＋候補品　の５種類に分類し、それぞれのCVを比較した。

比較は未補正、および各検体CVの平均値が低かったものの代表として、補正123、補正12、補正13について行った。

結果を表３に示す。

表３．分類分けした場合のCVの比較

		変異計数 未補正	変異計数 補正123	変異計数 補正12	変異計数 補正13	最大値	最小値
候補品	CV(5社平均値)	10.20	4.22	3.32	3.54	10.20	3.32
添加検体	CV(5社平均値)	5.69	4.14	4.53	3.90	5.69	3.90
添加検体+コントロール＆キャリブレータ	CV(5社平均値)	8.98	6.99	7.20	6.77	8.98	6.77
添加検体+候補品	CV(5社平均値)	6.22	4.15	4.39	3.86	6.22	3.86
添加検体+コントロール＆キャリブレータ＋候補品	CV(5社平均値)	9.10	6.72	6.82	6.46	9.10	6.46

表３からわかるように、今回の検証試験においては、未補正において最もCVが悪く、補正13、次いで補正12においてCVが低くなることがわかった。また分類で比較した場合、添加検体＋コントロール＆キャリブレータ、添加検体＋コントロール＆キャリブレータ＋候補品　のいずれかでCVが悪くなっていることがわかるが、これは前章で述べたように、コントロール＆キャリブレータでは「他社－自社」、候補品では「候補品4」での乖離（分散）が大きいことに起因していると考えられる。また候補品での未補正のCVが頭抜けて大きいが、これは平均する前のCV値が未補正では候補品1、2、3、4ともに大きいことに起因する。

４．候補品の平均前のCVおよび平均値のCV

		表示値	変異計数 未補正	変異計数 補正123	変異計数 補正12	変異計数 補正13	最大値	最小値
実試料標準物質候補品･測定値	1	0.50	17.75	0.82	0.00	0.00	17.75	0.00
	2	1.00	7.08	0.89	0.00	1.32	7.08	0.00
	3	1.50	4.67	0.34	1.69	0.00	4.67	0.00
	4	2.00	11.31	14.85	11.58	12.85	14.85	11.31
平均値			10.20	4.22	3.32	3.54	10.20	3.32

８．測定法の違いによるCVの差

測定法の違いによる、それぞれ分類におけるCVを比較した（色素法２社、電極法３社)。比較は、補正123で行った。

表５．測定法の違いによる、分類分けした場合の CV の比較（補正 123）

		変異計数 色素法(2)	変異計数 電極法(3)	変異計数 全体
候補品	CV (平均値)	1.60	4.71	4.22
添加検体	CV (平均値)	7.21	1.57	4.14
添加検体+コントロール＆キャリブレータ	CV (平均値)	9.85	3.63	6.99
添加検体+候補品	CV (平均値)	6.55	1.94	4.15
添加検体+コントロール＆キャリブレータ＋候補品	CV (平均値)	9.04	3.73	6.72

表５からわかるように、今回の検証試験においては、色素法と電極法で CV に差のあることがわかった。

まず色素法において、候補品を除く他の分類で電極法より CV が悪かったが、これは、色素法内１社（D 社（ドライケム））で乖離が大きく、それが平均としてみた場合、他１社の値を引き摺ってしまったためと考えられる。次に電極法において候補品の CV が悪かったが、これは、電極法内１社（E 社）における候補品 4（表示値 2.00mmol/L）の値の乖離が大きく、これが他２社の値を引き摺ってしまったためと考えられる。

なお、色素法と電極法を比較した場合、色素法の方が測定範囲が広い（大まかにいって、色素法は上限 5 mmol/L、電極法は上限 2 mmol/L 程度)。今回の検証試験の結果だけから判断すれば、候補品（後の常用血清標準物質）の濃度は 2.0mmol/L を上まわらない方が安全であると考えられる。実際、現在は品切れだが以前 HECTEF SRC 販売されていたイオン電極用リチウム一次標準血清 L91-1 の濃度は、低い方から順に 0.231、0.714、1.102mmol/L であった。

９．分類分けした場合の相関係数

これまでは主に得られた CV の結果から各種事項を推定してきたが、ここでは相関係数（R２乗値）を用いてそれらを検討した。

表６－１．分類分けした場合の相関係数の比較（測定値－５社平均値）

	測定値－5社平均値			変異計数 未補正	変異計数 補正123	変異計数 補正12	変異計数 補正13	最大値	最小値
候補品 - 表示値	回帰式	傾き	a	0.8990	1.0171	0.9624	0.9201		
		y切片	b	0.1613	0.1218	0.0317	0.0756		
		R^2値	R^2	0.9618	0.9456	0.9897	0.9600	0.9897	0.9456
添加検体 - 5社平均値	回帰式	傾き	a	0.9897	0.9896	0.9802	0.9907		
		y切片	b	0.0050	0.0114	0.0187	0.0113		
		R^2値	R^2	0.9952	0.9914	0.9882	0.9922	0.9952	0.9882
(添加検体+コントロール＆キャリブレータ) - 5社平均値	回帰式	傾き	a	0.9104	0.9248	0.9246	0.9250		
		y切片	b	0.1065	0.0928	0.0907	0.0934		
		R^2値	R^2	0.9108	0.9258	0.9257	0.9259	0.9259	0.9108
(添加検体+候補品) - 5社平均値	回帰式	傾き	a	0.9992	1.0031	0.9881	1.0029		
		y切片	b	0.0019	0.0004	0.0130	0.0006		
		R^2値	R^2	0.9904	0.9917	0.9913	0.9930	0.9930	0.9904
(添加検体+コントロール＆キャリブレータ＋候補品) - 5社平均値	回帰式	傾き	a	0.9155	0.9276	0.9316	0.9288		
		y切片	b	0.1006	0.0895	0.0826	0.0887		
		R^2値	R^2	0.9155	0.9276	0.9316	0.9288	0.9316	0.9155

※R 二乗値は R^2 と表記。黄色は二番目に高い値。候補品は対表示値。

表６－２．分類分けした場合の相関係数の比較（測定値－５社平均値または表示値）

	測定値－5社平均値または表示値			変異計数 未補正	変異計数 補正123	変異計数 補正12	変異計数 補正13	最大値	最小値
候補品 - 表示値	回帰式	傾き	a	0.8990	0.9138	0.9624	0.9201		
		y切片	b	0.1613	0.0934	0.0317	0.0756		
		R^2値	R^2	0.9618	0.9480	0.9897	0.9600	0.9897	0.9480
添加検体 - 5社平均値 (表示値はない)	回帰式	傾き	a	0.9897	0.9896	0.9802	0.9907		
		y切片	b	0.0050	0.0114	0.0187	0.0113		
		R^2値	R^2	0.9952	0.9914	0.9882	0.9922	0.9952	0.9882
(添加検体+コントロール＆キャリブレータ) - 5社平均値または表示値	回帰式	傾き	a	0.8816	0.9060	0.9386	0.9030		
		y切片	b	0.1095	0.0832	0.0515	0.0861		
		R^2値	R^2	0.8675	0.8742	0.8747	0.8730	0.8747	0.8675
(添加検体+候補品) - 5社平均値または表示値	回帰式	傾き	a	0.9898	0.9986	1.0020	0.9970		
		y切片	b	0.0015	0.0034	0.0016	0.0037		
		R^2値	R^2	0.9904	0.9928	0.9894	0.9941	0.9941	0.9894
(添加検体+コントロール＆キャリブレータ＋候補品) - 5社平均値または表示値	回帰式	傾き	a	0.8856	0.9114	0.9480	0.9091		
		y切片	b	0.1141	0.0815	0.0472	0.0826		
		R^2値	R^2	0.8799	0.8865	0.8889	0.8864	0.8889	0.8799

※R 二乗値は R^2 と表記。黄色は二番目に高い値。候補品は対表示値。

表６－１、２からわかるように、今回の検証試験においては、補正 12 または補正 13 で最も相関が良く、補正 123 がそれに次ぐことが読み取れた。また分類で比較した場合、添加検体＋コントロール＆キャリブレータ、添加検体＋コントロール＆キャリブレータ＋候補品　のいずれかで相関が低くなっているが、これは前の章でも触れたように、コントロール＆キャリブレータでは「他社－自社」、候補品では「候補品 4」での乖離（分散）が大きいことに起因すると考えられる。

10. 各検体の５社 CV と測定値の関係

各検体の５社 CV と測定値の関係について、検討した。比較は、未補正、補正 123 で行った。

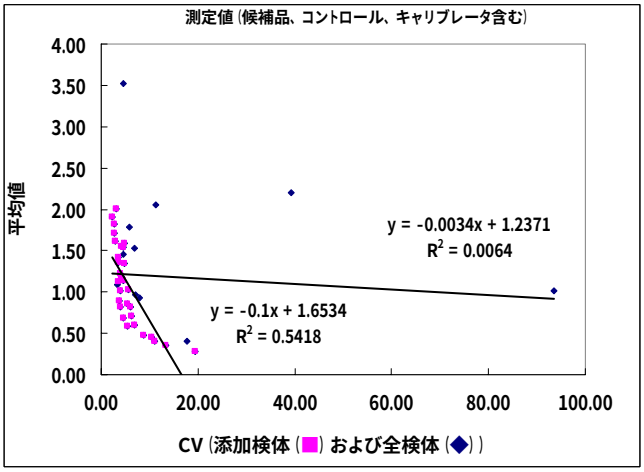


図７－１．CV と測定値の関係
（未補正、５社平均値）

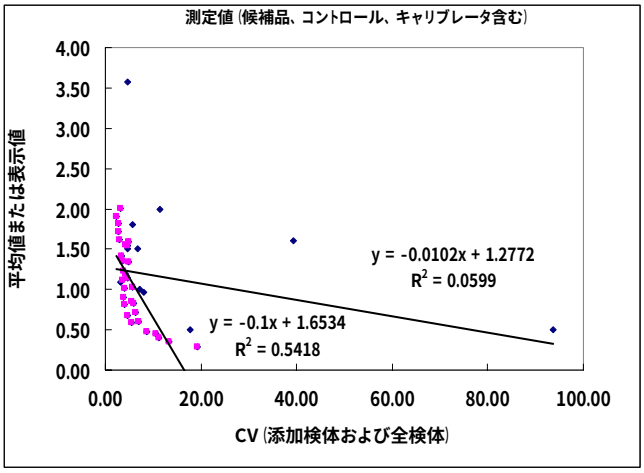


図７－２．CV と測定値の関係
（未補正、５社平均値および表示値）

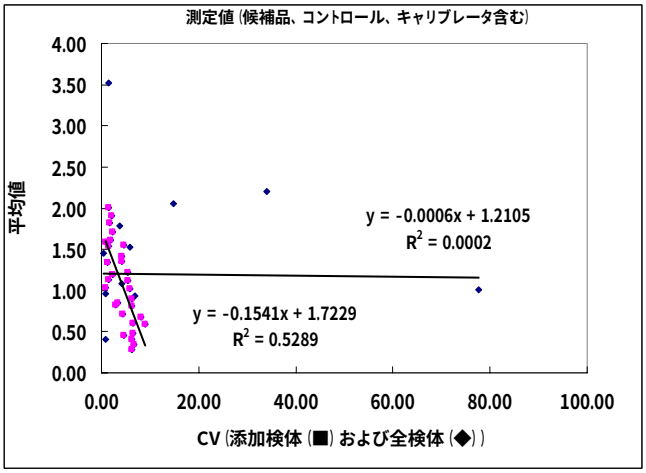


図８－１．CV と測定値の関係
（補正 123、５社平均値）

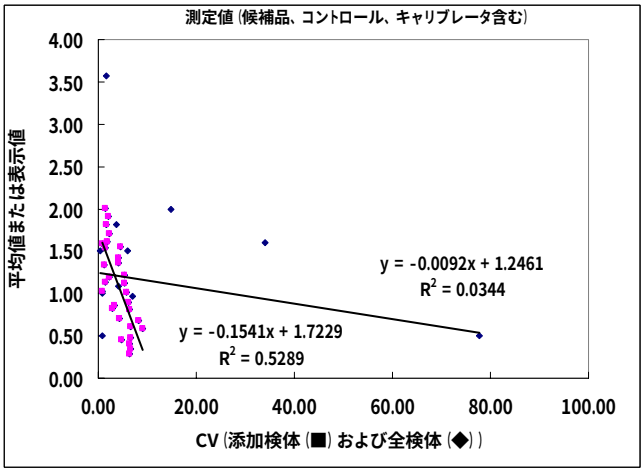


図８－２．CV と測定値の関係
（補正 123、５社平均値および表示値）

図７、８からわかるように、少なくとも添加検体においては、CV と測定値は緩い相関関係（測定値が小さいほど CV が大きい）があるように思われる。これは測定値が小さいと測定精度が悪くなり、分散が増すと考えれば納得がいく。また未補正と補正 123 で添加検体の相関を比較すると、未補正では 0.5mmol/L を下まわったところで急激に CV が増大しているが、補正 123 ではそういった傾向は見られなかった。これは、CV のみの比較からでは推測できなかったが、候補品で補正を掛けることにより値が収束する（５社それぞれの値が未補正のものより近づく）ことを裏づけていると思われる。

11．収束目標値の検討

報告書本文にもあるように、血清リチウムに関しては、現在のところ国内各種サーベイランスの対象になっていないことから、参考となる調査結果が国内に存在しない。

そこで世界30,000施設以上が参加しているCAP国際臨床検査評価プログラム（College of American Pathologists：略称CAP）における血清リチウムの評価結果を参考とすることにした。

CAPではn=10以上の測定グループをPeer Groupとし、そのGroup内で集計し、各項目ごとに評価基準を設定している。血清リチウムの評価基準は、目標値±0.3mmol/L（または±20%のどちらか大きい方）で、この値を超えるとNo acceptableという評価になる。また濃度についてはC-06～C-10と５濃度設定されており、年度によって若干のばらつきはあるものの、大まかな値は、0.5～2.0mmol/L程度となっている。

本検証試験で得られた結果とCAPでの結果を比較する方法は種々考えられようが、今回は各検体の５社CVの平均で比較してみることにした。

2003年度（米国）から2005年度（米国）に行われた血清リチウムのC-Bサーベイの結果、および本検証試験で得られた結果を以下に示す。

表７．2003年度から2005年度に行われたC-Bサーベイの結果

2005	C-06	C-07	C-08	C-09	C-10	平均値（C-06～C-09）
施設数	1780	1799	1780	1794	1787	
平均値	0.95	1.55	0.64	1.4	1.99	
S.D.	0.08	0.09	0.09	0.08	0.15	
C.V.	8.2	5.7	14.2	5.4	7.8	8.26
2004	C-06	C-07	C-08	C-09	C-10	
施設数	1810	1812	1805	1799	1802	
平均値	1.27	0.79	1.6	1.76	2.21	
S.D.	0.008	0.09	0.09	0.09	0.14	
C.V.	8.7	11.6	5.3	5.1	6.4	7.42
2003	C-06	C-07	C-08	C-09	C-10	
施設数	1781	1788	1801	1800	1799	
平均値	2.17	2.02	0.98	1.73	1.44	
S.D.	0.18	0.18	0.09	0.11	0.09	
C.V.	8.3	7.9	8.7	6.6	5.9	7.48
	2005、2004、2003すべてのC-06～C-10の平均値					7.72

表３．分類分けした場合の CV の比較

		変異計数 未補正	変異計数 補正123	変異計数 補正12	変異計数 補正13	最大値	最小値
候補品	CV（5社平均値）	10.20	4.22	3.32	3.54	10.20	3.32
添加検体	CV（5社平均値）	5.69	4.14	4.53	3.90	5.69	3.90
添加検体+コントロール＆キャリブレータ	CV（5社平均値）	8.98	6.99	7.20	6.77	8.98	6.77
添加検体+候補品	CV（5社平均値）	6.22	4.15	4.39	3.86	6.22	3.86
添加検体+コントロール＆キャリブレータ＋候補品	CV（5社平均値）	9.10	6.72	6.82	6.46	9.10	6.46

未補正のものでは、候補品、添加検体＋コントロール&キャリブレータ、添加検体＋コントロール&キャリブレータ＋候補品　の３分類において CAP の全平均値を上まわるが、代表的な補正を掛けたものでは、いずれもその値を下まわっている。特に添加検体に限れば、３パーセント程度と大きく下まわっていることから、少なくとも補正を掛ける効果はあったと結論づけられるであろう。

12．今後の課題

以下に現時点で判断がつかない課題を列挙する。

候補品について

１）性状は本検証試験もので良いかどうか？

２）ポイント数は３ポイントで良いか？

３）濃度の上限は 2.00mmol/L を超えない設定で良いか？

４）市販キャリブレータの候補品への適応は考慮しなくて良いか？

５）上記を解決するためには、測定数および測定法を増やす必要がある。

６）また本検証試験では正確さ（および不確かさ）の評価についてはスキップしているので、次段階ではそれを実行する必要がある。

評価用実検体について

１）今回は実検体が手に入らなかったため添加検体で評価を行ったが、次段階へと進むためには、少なくとも一度は実検体を交えた系で測定し、測定法の違いも含めた交差反応性を評価する必要がある。

２）色素法、電極法、またはそれ以外のフレーム法などの測定法により得られた値を収束のターゲットとした場合、候補品と同様、検体濃度をある範囲に設定する必要が生じる。だがその場合、例えばある測定法では測定範囲外となってしまう濃度まで測定範囲があるキットまたは装置の当該濃度での正確性を保障する方法がなくなってしまう。これにどう対応するか（またはしないか）を考える必要がある。考え方としては、当該メーカーがトレーサビリティチェーンにおいてより上位にある標準品（もしくは公的標準物質など）でトレーサブルであるとしているならば、特に問題ないともいえる。

コントロール&キャリブレータについて

１）証試験では、代表者の意向もあり、コントロール&キャリブレータについても測定および評価を行ったが、今後の試験でも継続してそれを行う必要があるかどうか？　今回測定した種

類では少ないというのであれば、少なくとも市場でシェアを占めている製品については測定＆評価する必要があると考えられる。

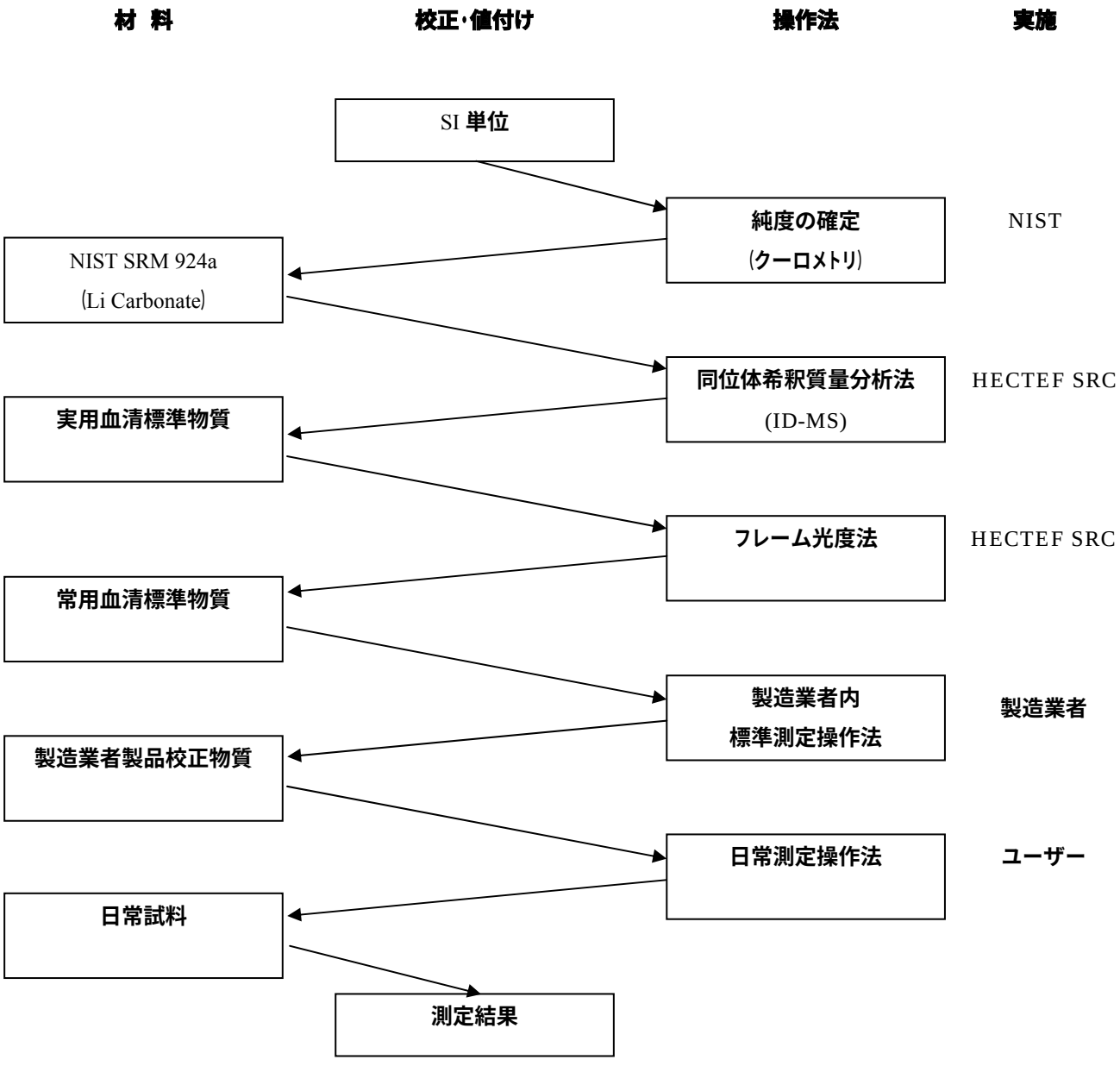
2）また候補品の項で述べたように、市販キャリブレータの候補品への適応は考慮しなくて良いのかどうか、検討する必要もある。

その他

1）本検証試験では、候補品（高高濃度）が１社で乖離し、またコントロール＆キャリブレータでは他社製品を測定する際に乖離が大きかった。今回のデータに限っていえば、n=3 でもあり、得られた測定値自体は疑えないと考えられるが、たまたま装置の調子が悪く、結果が本来のものと変わってしまったという可能性までは否定できない。今後は、そのような場合への対処法を考える必要があると思われる。たとえば測定結果の解析者（社）が、ある乖離基準を元に当該メーカーに信頼できる再測定を依頼するなど、ルールを確立する必要があろう。

別紙４：トレーサビリテイ・チェーン

リチウム測定における構成の階層段階とトレーサビリティ連鎖



２－４－２－７　血清総ビリルビン

要旨

１）WG の現状

① 開始時点の確認

・尿中総ビリルビン測定試薬は試薬販売メーカーがないことが判明したため、血清総ビリルビンのみに絞って検討することにした。

・現在でもサーベイ的にはばらつきがないレベルだが、「実試料系標準物質」を作ることが望まれている。

② 実試料標準物質候補品

・NIST SRM916aを新鮮正常ヒト血清ベースに添加して、４水準を調製し、冷凍品とした。

・各社に配布し、同時にヒト血清を測定して標準化が可能であるかを検討した。

③ 結果

・酸化法(酵素、化学)とジアゾ法に大別して評価した。

・酸化法では、各社キャリブレータで収束しており、実試料標準物質候補品を用いても、同程度の収束であり、収束効果は認められなかった。

・ジアゾ法では、実試料標準物質候補品により、収束効果は認められた。

・実試料標準物質作製の有用性はありと判断した。

２）今後の予定および問題点

・平成 17 年度の研究において、実試料標準物質候補品を用いて検証試験も行い、その有用性について検証した。

・平成 18 年度は、これまでの結果を基に実試料標準物質候補品作製のための本格的な作業を行う。実試料標準物質候補品での収束性の再検証の確認をした後に、実試料標準物質とし、作製のプロトコルの作業を行うと同時に基準測定操作法の設定を行う。

１．目的

本調査研究項目群、C2（血清リチウム、血清総ビリルビン）内の血清総ビリルビンにおいて、「血清総ビリルビンの実試料標準物質候補品を調製し、それを用いて市販キットのデータ収束可能性について検証を行う」こと。

２．委員会の構成

【WG 名　C2（項目：血清総ビリルビン、血清リチウム)】

柱 1、C2 担当　中野　頼人（株式会社シノテスト）

運営管理者　水口　克彦（東洋紡）

アドバイザー（臨床）　なし

アドバイザー（技術）　桑　克彦（筑波大学大学院人間科学総合研究科　助教授)、
森下　芳孝（三重大学医学部附属病院中央検査部　技師長）

【技術担当者】

責任者（主に血清総ビリルビン）　高山　正治（アルフレッサ　ファーマ株式会社）

責任者（主に血清リチウム）　秋山　英時（株式会社常光）

山下　章吾（アークレイマーケティング株式会社）

小林　隆（栄研化学株式会社）

樋渡　亮二（オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス株式会社）

斉藤　憲祐（デイドベーリング株式会社）

須釜　裕司（日東紡績株式会社）

牧内　肇（富士写真フィルム株式会社）

横田　敦子（ベックマン・コールター株式会社）

秋元　一隆（株式会社三菱化学ヤトロン）

吉海　毅（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社）

花田　寿郎（和光純薬工業株式会社）

３．委員会の開催

第 1 回会合　2005/11/15（火）13：00～16：00（臨床検査薬協会会議室）

第 2 回会合　2005/12/19（金）13：00～16：00（臨床検査薬協会会議室）

第 3 回会合　2006/01/11（水）14：00～17：00（臨床検査薬協会会議室）

第 4 回会合　2006/02/22（水）14：00～17：00（臨床検査薬協会会議室）

第 5 回会合　2006/03/08（水）10：00～13：00（臨床検査薬協会会議室）

※※　初回のみ運営管理者（臨薬協・技術委員会。運営委員 JCCLS (Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards：日本臨床検査標準協議会）、臨薬協と WG 間の連絡調整役）が WG を召集、2 回目以降は責任者が開催。

４．調査研究の概要

（１）測定値の互換性の現状

現在でもサーベイ的にはばらつきがないレベルと考えられるが、各市販測定試薬のキャリブレータを用いて測定されているため、測定方法により測定値に違いがあると考えられる。そのため、マトリックス効果を考えて血清ベースの「実試料系標準物質」を作ることが望まれている。

（２）標準化および標準物質の設定経過

標準化および実試料標準物質候補品の設定は以下の実施計画によって行った。

１）目的

NIST（National Institute of Standards and Technology：（米国標準技術研究所）から公的標準 SRM916a を購入し、総ビリルビンの実試料標準物質候補品を調製し、それを各社の測定システムで試料として測定することで、患者試料との反応性の違いの有無を確認する。反応性が同じ場合には、この候補品で検量線を作成した場合のシミュレーションを行い、市販キットのデータの収束可能について検証を行う。

本検討は血清総ビリルビン測定用キットおよび測定用装置を対象とした。

実試料標準物質候補品は、遊離ビリルビンを用いたものを、HECTEF SRC（Health Care Technology Foundation, Standard Reference Center（HECTEF SRC）から購入する。

２）手順

第１回会合後、WG 参加メーカーを対象に実試料標準物質に望まれる性状、品質等の調査を行った。アンケートの結果、下記の内容で合意が得られた。

・NIST の公的標準 SRM916a を購入して、HECTEF SRC で実試料標準物質候補品を調製する。
・新鮮正常ヒト血清をベースとして総ビリルビン濃度　４レベル（レベル１：約 1m g/100mL、レベル２：約 5m g/100mL、レベル３：約 10m g/100mL、レベル４：約 20m g/100mL）のものを各レベルとも 60mL 以上調製する（安定化剤および有機溶媒等は無添加：調製に関わる詳細は、すべて開示していただく）。
・各レベルとも遮光性のあるバイアル瓶（HECTEF-SRC に任せる）に 1mL ずつ分注して-70℃以下で凍結保存する（各レベルとも 55 本必要；11 社に５本配布）。
・値付け作業は HECTEF SRC が行う（HECTEF SRC 推奨法）。
この場合、同時に認証値及び不確かさ（ISO GUM（International Organization for Standardization、Guide to the Expressing of Uncertainty in Measurements：国際標準化機構、計測における不確かさの表現のガイド））の開示も求める。

①　評価用実試料の準備

・JCCLS が実試料を入手する。
・濃度レベルごとに実試料をプールして実試料を調製する。
・実試料の n 数は 30～50 例程度とする。

総ビリルビン濃度 10m g/100mL 以下の実試料（6mL 以上）：20 例以上
総ビリルビン濃度 10m g/100mL 以上の実試料（6mL 以上）：10 例以上
・各実試料とも遮光性のあるバイアル瓶(HECTEF に任せる)に 0.5mL ずつ分注して-70℃以下で凍結保存する（各実試料とも１１本必要)。

② 各社キットまたは装置での測定
・実試料標準物質候補品および評価用実試料とも融解後、当日使用する。
・各社にて、自社キット、自社キャリブレータまたは測定用装置を用いて測定を行う。
・測定条件は各社の標準操作方法に従って行う。
・実試料標準物質候補品、各社キャリブレータおよび評価用実試料をそれぞれ検体として３重測定を行う。

③ 結果集計
・各社の測定値と実試料標準物質候補品にて校正された各社の測定補正値の収束性を検証する。（別紙１）

（３）標準物質の設定

酸化法とジアゾ法とに大別してデータ解析を行った。

酸化法は各社の測定値である程度収束性がみられるため、実試料標準物質候補品(計算式より補正)を用いてもさらなる収束性効果は認められなかった。

一方、ジアゾ法は実試料標準物質候補品（10mg/dL）をキャリブレータとした場合（計算式より補正）に収束性効果は認められた。

（４）値付けの測定方法の選択

トレーサビリティ連鎖の考え方からすると、公的標準品（NIST916a）はモル吸光度係数を測定する方法が望ましく、実試料標準物質候補品を値付けする方法は AACC reference method 等の標準化された勧告法（案）が望ましい。各社標準液を値付けする方法は各社標準測定操作法、日常試料を値付けする方法は日常試料測定法が望ましい。

本WGのメーカーサーベイで用いられた日常試料測定法は、酵素酸化法、化学酸化法、ジアゾ法およびドライケミストリー法である。

５．実試料標準物質候補品の作成プロトコル

（１）トレーサビリティシステム

SI 単位系を最上位に位置づける体系とした。ビリルビン純品を SI 単位にトレーサブルとする基準分析法については現在のところ知られていない。又、血清中のビリルビンを測定する実用基準法についても、国際的に認められた方法は確立されていない。

今回の研究においては、NIST(National Institute of Standards and Technology)より世界で唯一供給されている標準物質 SRM916a(Bilirubin:98.3%±0.3%)を高位標準物質として位置付けることとした。この SRM916a の純度(認証値)は不純物を信頼のおける方法により測定し、いわゆる差数法により求められたものであるが、この不純物測定の信頼性は極めて高い。この SRM916a を一定規格内の血清に添加した。原料血清にも内因性のビリルビンが含まれているが、これを完全に除去することは困難なため、それを 0.1mg/dL 以下に規定し、後に標準添加法によってブランクを確定した。SRM916a 添加量にこのブランクを加えたものを表示値とした。

（２）性状規格

新鮮正常ヒト血清をベースとして総ビリルビン濃度　1～20ｍｇ/100mL の範囲で４レベルとする。公的標準（管理）物質には NIST（SRM916a）を用いる。

おおよその濃度範囲は以下の通り。

レベル１：約 1m g/100mL

レベル２：約 5m g/100mL

レベル３：約 10m g/100mL

レベル４：約 20m g/100mL

密度　1.024g/cm^3（25℃）とする。

粘性率　1.6mPa・s（20℃）とする。

水分量　0.928Kg/L（25℃）とする。

pH　7.6（37℃）とする。

感染性　HBs 抗原陰性、HCV 抗体及び HIV 抗体不検出のもの。

５mL のバイアル瓶（遮光）に、調製した試料を 1mL ずつ充填し、直ちに－70℃以下に急速凍結して保存する。

（３）基準測定操作法

重量添加を行うので基準測定操作法は定めていない。

（４）値付けの手順

SRM916a を一定規格内の血清に添加した。原料血清にも内因性のビリルビンが含まれているが、これを完全に除去することは困難なため、それを 0.1mg/dL 以下に規定し、後に標準添加法によってブランクを確定した。SRM916a 添加量にこのブランクを加えたものを表示値とした。

（５）認証値と不確かさ(ISO GUM に従う)

（４）項の値付けの手順により求められたものを認証値(表示値)とした。本標準物質候補品の濃度測定は日常法による測定(ｎ=1)しか行われていないので、真の不確かさは求められない。よっ

て、不確かさについては、「調製の標準不確かさ」、「SRM 916a の標準不確かさ」および「ブランク測定の標準不確かさ」の 2 乗和より標準不確かさを算出した。レベル 1、レベル 2、レベル 3 およびレベル 4 の標準不確かさはそれぞれ 0.05mg/dL，0.05mg/dL，0.05mg/dL,および 0.06mg/dL となる。

６．今後の課題

平成 17 年度の研究において、実試料標準物質候補品を用いて検証試験も行い、その有用性について検証した。

平成 18 年度は、これまでの結果を基に実試料標準物質候補品作製のための本格的な作業を行う。実試料標準物質候補品での収束性の再検証の確認をした後に、実試料標準物質とし、作製のプロトコルの作業を行うと同時に基準測定操作法の設定を行う。

７．結び

平成 17 年度の作業において、血清総ビリルビン実試料標準物質候補品の選択を行い、その後の作業の方向性を定めた。

＜添付資料＞

別紙１：サーベイデータ解析考察とデータ集計

別紙２：トレーサビリティ連鎖

別紙１

T-BIL サーベイデータ解析考察

市販キットの互換性は､各キットの実試料測定値の平均値との相関係数は酸化法において 0.999 以上であり、ジアゾ法においても 0.996 以上であった。一方、各社の血清測定値の平均値で全体の収束度をみると（平均値、SD と CV)、酸化法では平均値 2.39mg/dl２、SD0.12mg/dl、CV7.10%と、ジアゾ法では平均値 2.36mg/dl、SD0.22mg/dl、CV11.26%となった。

実試料標準物質候補品（４濃度：1mg/dL、5mg/dL、10mg/dL、20mg/dL）は各キットですべて直線性が得られたが、実試料とほぼ同じ傾きであったのは、酸化法で３社、ジアゾ法で２社であった。また、各社キャリブレータ及び実試料標準物質候補品の相対残差は、酸化法では実試料標準物質候補品（10mg/dL)、実試料標準物質候補品（20mg/dL)、キャリブレータ２品目が多くのキットで小さな値であり、ジアゾ法では実試料標準物質候補品（20mg/dL)、実試料標準物質候補品（10mg/dL）が多くのキットで小さな値であった。

実試料標準物質候補品（10mg/dL）をキャリブレータとした場合（計算式より補正)、各社の血清測定値の平均値で全体の収束度をみると（平均値、SD と CV)、酸化法では平均値 2.21mg/dl、SD0.13mg/dl、CV8.22%と、ジアゾ法では平均値 2.21mg/dl、SD0.14mg/dl、CV7.80%となった

また、実試料標準物質候補品（回帰式）をキャリブレータとした場合（計算式より補正)、各社の血清測定値の平均値で全体の収束度をみると(平均値､SD と CV)､酸化法では平均値 2.12mg/dl、SD0.13mg/dl、CV10.98%と、ジアゾ法では平均値 2,23mg/dl、SD0.22mg/dl、CV15.16%となった。

今回、メーカーサーベイを行い、実試料標準物質候補品による実試料測定値の収束性の効果について検討した。参加したメーカーは１１社（１社で２測定法を実施）で、酵素酸化法４社、化学酸化法２社、ジアゾ法６社（ドライケミストリを含む）である。データ解析では酸化法とジアゾ法とに大別して解析を行った。

その結果、酸化法は各社の測定値である程度収束性がみられるため、実試料標準物質候補品(計算式より補正)を用いてもさらなる収束性効果は認められなかった。一方、ジアゾ法は実試料標準物質候補品（10mg/dL）をキャリブレータとした場合（計算式より補正）に収束性効果は認められた。

別紙1

血清総ビリルビン測定結果集計　酸化法
測定値

		表示値	測定法 A	B	C	D	E	F	平均値	MIN.	MAX.	SD	CV
実試料標準物質候補品	S1	1.10	1.29	1.28	1.39	1.31	1.26	1.18	1.28	1.18	1.39	0.07	5.27
	S2	5.10	5.53	5.30	5.73	5.57	6.19	5.16	5.58	5.16	6.19	0.36	6.47
	S3	10.10	10.84	10.26	11.24	10.85	12.19	10.33	10.95	10.26	12.19	0.71	6.45
	S4	20.10	21.35	19.89	22.21	21.25	23.97	20.85	21.59	19.89	23.97	1.39	6.43
各社のｷｬﾌﾞﾚｰﾀ	CAL1	1.00	1.23	1.21	1.02	1.24	1.29	1.15	1.19	1.02	1.29	0.10	8.00
	CAL2	8.29	8.28	7.86	6.86	8.16	8.65	7.81	7.94	6.86	8.65	0.61	7.68
	CAL3	11.40	11.37	11.43	14.95	11.88	11.68	11.88	12.20	11.37	14.95	1.37	11.20
	CAL4	6.80	6.71	6.64	7.64	7.21	6.93	6.93	7.01	6.64	7.64	0.37	5.23
	CAL5	0.80	0.99	0.95	0.93	0.97	ゼロ	0.92	0.95	0.92	0.99	0.03	3.07
	CAL6	21.00	19.88	19.62	21.15	20.93	ゼロ	20.49	20.41	19.62	21.15	0.66	3.23
	CAL7	11.00	9.79	9.93	8.67	10.03	10.75	9.64	9.80	8.67	10.75	0.67	6.86
	CAL8		27.38	26.82	25.40	27.57	27.98	28.22	27.23	25.40	28.22	1.02	3.75
	CAL9	0.83	0.74	0.75	0.77	0.78	0.77	0.72	0.75	0.72	0.78	0.02	2.85
	CAL10	9.83	8.06	7.98	9.56	8.82	8.43	8.40	8.54	7.98	9.56	0.58	6.82
	CAL11	21.45	17.54	17.32	20.68	19.21	18.34	18.89	18.66	17.32	20.68	1.23	6.59
	CAL12	9.25	8.32	8.38	9.28	8.99	8.61	8.39	8.66	8.32	9.28	0.39	4.50
	CAL13	9.44	8.11	8.11	8.88	8.69	測定せず	8.18	8.39	8.11	8.88	0.36	4.34
	CAL14	10.10	9.04	9.09	10.19	10.17	9.43	9.54	9.58	9.04	10.19	0.50	5.27
	CAL15	11.60	11.46	11.63	14.94	12.05	11.65	12.18	12.32	11.46	14.94	1.31	10.65
	CAL16	12.50	11.93	11.68	12.38	12.29	12.41	12.50	12.20	11.68	12.50	0.32	2.65
平均値									10.37			0.60	5.79
実試料	1		4.18	4.15	4.36	4.12	4.34	3.99	4.19	3.99	4.36	0.14	3.34
	2		3.55	3.53	3.54	3.46	3.61	3.38	3.51	3.38	3.61	0.08	2.30
	3		1.25	1.16	1.00	1.24	1.25	1.11	1.17	1.00	1.25	0.10	8.68
	4		2.96	2.95	3.05	2.93	3.09	2.77	2.96	2.77	3.09	0.11	3.78
	5		2.61	2.54	2.58	2.58	2.76	2.38	2.58	2.38	2.76	0.12	4.68
	6		1.69	1.59	1.43	1.67	1.72	1.49	1.60	1.43	1.72	0.12	7.25
	7		2.25	2.22	2.26	2.20	2.27	2.08	2.21	2.08	2.27	0.07	3.17
	8		15.64	15.08	16.27	15.58	16.19	15.11	15.64	15.08	16.27	0.51	3.26
	9		1.12	1.05	0.90	1.15	1.10	0.98	1.05	0.90	1.15	0.09	9.05
	10		1.26	1.16	0.98	1.25	1.26	1.10	1.17	0.98	1.26	0.11	9.69
	11		1.18	1.13	0.99	1.22	1.17	1.06	1.12	0.99	1.22	0.09	7.68
	12		1.09	1.03	0.78	1.11	1.09	0.95	1.01	0.78	1.11	0.13	12.47
	13		1.22	1.20	1.07	1.22	1.24	1.11	1.18	1.07	1.24	0.07	5.94
	14		4.97	4.87	5.30	4.91	5.08	4.69	4.97	4.69	5.30	0.20	4.13
	15		1.19	1.13	0.91	1.20	1.21	1.03	1.11	0.91	1.21	0.12	10.88
	16		1.71	1.66	1.50	1.69	1.75	1.56	1.65	1.50	1.75	0.10	5.88
	17		1.44	1.38	1.15	1.46	1.45	1.29	1.36	1.15	1.46	0.12	8.84
	18		1.81	1.75	1.63	1.78	1.80	1.63	1.73	1.63	1.81	0.08	4.71
	19		7.26	7.14	7.64	7.17	7.47	6.92	7.27	6.92	7.64	0.26	3.53
	20		2.62	2.57	2.63	2.54	2.63	2.43	2.57	2.43	2.63	0.08	3.06
	21		1.78	1.77	1.64	1.77	1.82	1.64	1.74	1.64	1.82	0.08	4.33
	22		1.93	1.90	1.81	1.90	1.96	1.78	1.88	1.78	1.96	0.07	3.76
	23		2.06	1.99	1.93	2.04	2.08	1.89	2.00	1.89	2.08	0.08	3.78
	24		1.99	1.93	1.89	1.97	2.01	1.82	1.94	1.82	2.01	0.07	3.64
	25		1.65	1.59	1.46	1.65	1.67	1.52	1.59	1.46	1.67	0.08	5.30
	26		1.67	1.59	1.43	1.66	1.67	1.51	1.59	1.43	1.67	0.10	6.35
	27		2.22	2.20	2.21	2.23	2.25	2.13	2.21	2.13	2.25	0.04	1.83
	28		1.12	1.05	0.88	1.12	1.09	0.99	1.04	0.88	1.12	0.09	9.12
	29		0.52	0.46	0.31	0.55	0.50	0.44	0.46	0.31	0.55	0.09	18.56
	30		0.53	0.46	0.29	0.55	0.51	0.44	0.46	0.29	0.55	0.09	20.06
	31		0.90	0.85	0.68	0.92	0.90	0.79	0.84	0.68	0.92	0.09	10.70
	32		0.65	0.59	0.40	0.68	0.64	0.55	0.58	0.40	0.68	0.10	17.42
平均値									2.39			0.12	7.10

別紙1

血清総ビリルビン測定結果集計　酸化法

補正：　実資料標準物質候補品の表示値（10mg/100mL）

			測定法										
		表示値	A	B	C	D	E	F	平均値	MIN.	MAX.	SD	CV
各社のｷｬﾌﾞﾚｰﾀ	CAL1	1.00	1.15	1.19	0.92	1.15	1.07	1.13	1.10	0.92	1.19	0.10	8.94
	CAL2	8.29	7.71	7.74	6.17	7.60	7.17	7.64	7.34	6.17	7.74	0.61	8.31
	CAL3	11.40	10.59	11.25	13.44	11.06	9.68	11.61	11.27	9.68	13.44	1.25	11.11
	CAL4	6.80	6.25	6.54	6.87	6.72	5.75	6.78	6.48	5.75	6.87	0.42	6.50
	CAL5	0.80	0.93	0.94	0.84	0.90	ゼロ	0.90	0.90	0.84	0.94	0.04	4.39
	CAL6	21.00	18.51	19.32	19.01	19.49	ゼロ	20.03	19.27	18.51	20.03	0.56	2.92
	CAL7	11.00	9.12	9.78	7.80	9.34	8.91	9.42	9.06	7.80	9.78	0.69	7.57
	CAL8		25.50	26.41	22.83	25.67	23.19	27.59	25.20	22.83	27.59	1.85	7.35
	CAL9	0.83	0.69	0.74	0.70	0.72	0.64	0.71	0.70	0.64	0.74	0.04	5.14
	CAL10	9.83	7.51	7.86	8.60	8.21	6.99	8.21	7.90	6.99	8.60	0.58	7.31
	CAL11	21.45	16.34	17.06	18.59	17.89	15.20	18.47	17.26	15.20	18.59	1.32	7.66
	CAL12	9.25	7.75	8.26	8.34	8.37	7.14	8.20	8.01	7.14	8.37	0.48	6.03
	CAL13	9.44	7.55	7.99	7.98	8.09	測定せず	8.00	7.92	7.55	8.09	0.21	2.68
	CAL14	10.10	8.42	8.95	9.16	9.47	7.82	9.32	8.86	7.82	9.47	0.63	7.07
	CAL15	11.60	10.67	11.45	13.43	11.22	9.65	11.90	11.39	9.65	13.43	1.26	11.09
	CAL16	12.50	11.11	11.50	11.12	11.45	10.29	12.22	11.28	10.29	12.22	0.63	5.60
平均値									9.62			0.67	6.85
実試料	1		3.89	4.09	3.92	3.84	3.60	3.90	3.87	3.60	4.09	0.16	4.10
	2		3.30	3.47	3.18	3.22	2.99	3.30	3.25	2.99	3.47	0.16	4.89
	3		1.16	1.15	0.90	1.15	1.04	1.08	1.08	0.90	1.16	0.10	9.45
	4		2.76	2.90	2.74	2.73	2.56	2.71	2.73	2.56	2.90	0.11	3.95
	5		2.43	2.50	2.32	2.41	2.28	2.33	2.38	2.28	2.50	0.08	3.43
	6		1.57	1.57	1.29	1.56	1.43	1.46	1.48	1.29	1.57	0.11	7.54
	7		2.09	2.18	2.03	2.05	1.88	2.03	2.04	1.88	2.18	0.10	4.87
	8		14.56	14.85	14.62	14.50	13.42	14.77	14.46	13.42	14.85	0.52	3.62
	9		1.04	1.04	0.81	1.07	0.91	0.96	0.97	0.81	1.07	0.10	10.21
	10		1.17	1.15	0.88	1.17	1.04	1.07	1.08	0.88	1.17	0.11	10.23
	11		1.10	1.12	0.89	1.13	0.97	1.03	1.04	0.89	1.13	0.10	9.19
	12		1.02	1.02	0.70	1.03	0.90	0.93	0.93	0.70	1.03	0.12	13.37
	13		1.14	1.18	0.96	1.13	1.03	1.08	1.09	0.96	1.18	0.08	7.36
	14		4.63	4.80	4.76	4.57	4.21	4.58	4.59	4.21	4.80	0.21	4.57
	15		1.11	1.12	0.81	1.12	1.00	1.01	1.03	0.81	1.12	0.12	11.46
	16		1.60	1.63	1.35	1.58	1.45	1.53	1.52	1.35	1.63	0.11	7.05
	17		1.34	1.36	1.04	1.36	1.20	1.26	1.26	1.04	1.36	0.13	9.99
	18		1.68	1.72	1.46	1.65	1.49	1.60	1.60	1.46	1.72	0.10	6.55
	19		6.76	7.03	6.87	6.68	6.19	6.76	6.72	6.19	7.03	0.28	4.23
	20		2.44	2.53	2.36	2.37	2.18	2.37	2.38	2.18	2.53	0.12	4.88
	21		1.66	1.74	1.48	1.65	1.51	1.61	1.61	1.48	1.74	0.10	6.13
	22		1.80	1.87	1.62	1.77	1.62	1.74	1.74	1.62	1.87	0.10	5.72
	23		1.92	1.96	1.74	1.90	1.72	1.85	1.85	1.72	1.96	0.10	5.35
	24		1.85	1.90	1.70	1.84	1.66	1.78	1.79	1.66	1.90	0.09	5.23
	25		1.54	1.57	1.31	1.53	1.39	1.49	1.47	1.31	1.57	0.10	6.82
	26		1.56	1.57	1.28	1.54	1.39	1.48	1.47	1.28	1.57	0.11	7.73
	27		2.06	2.16	1.99	2.07	1.86	2.08	2.04	1.86	2.16	0.10	5.04
	28		1.04	1.03	0.79	1.05	0.90	0.97	0.96	0.79	1.05	0.10	10.64
	29		0.49	0.45	0.28	0.51	0.41	0.43	0.43	0.28	0.51	0.08	19.25
	30		0.49	0.45	0.26	0.51	0.43	0.43	0.43	0.26	0.51	0.09	20.40
	31		0.84	0.84	0.61	0.86	0.75	0.77	0.78	0.61	0.86	0.09	11.63
	32		0.61	0.58	0.36	0.63	0.53	0.54	0.54	0.36	0.63	0.10	18.03
平均値									2.21			0.13	8.22

別紙1

血清総ビリルビン測定結果集計　酸化法

補正:　実資料標準物質候補品との回帰式

		表示値	測定法 A	B	C	D	E	F	平均値	MIN.	MAX.	SD	CV
各社のｷｬﾌﾞﾚｰﾀ	CAL1	1.00	1.03	0.95	0.79	0.99	1.05	1.17	1.00	0.79	1.17	0.13	12.78
	CAL2	8.29	7.71	7.75	6.11	7.59	7.21	7.59	7.33	6.11	7.75	0.63	8.54
	CAL3	11.40	10.64	11.40	13.49	11.14	9.76	11.51	11.32	9.76	13.49	1.24	10.95
	CAL4	6.80	6.22	6.51	6.82	6.69	5.78	6.74	6.46	5.78	6.82	0.40	6.15
	CAL5	0.80	0.80	0.69	0.70	0.73	ゼロ	0.95	0.78	0.69	0.95	0.11	13.58
	CAL6	21.00	18.69	19.77	19.14	19.76	ゼロ	19.81	19.43	18.69	19.81	0.50	2.57
	CAL7	11.00	9.13	9.87	7.76	9.37	8.97	9.35	9.08	7.76	9.87	0.71	7.84
	CAL8		25.80	27.13	23.01	26.09	23.41	27.26	25.45	23.01	27.26	1.83	7.19
	CAL9	0.83	0.56	0.48	0.56	0.55	0.61	0.76	0.59	0.48	0.76	0.09	15.78
	CAL10	9.83	7.50	7.87	8.57	8.22	7.03	8.15	7.89	7.03	8.57	0.55	7.03
	CAL11	21.45	16.48	17.42	18.70	18.12	15.34	18.27	17.39	15.34	18.70	1.27	7.31
	CAL12	9.25	7.74	8.28	8.32	8.38	7.18	8.15	8.01	7.18	8.38	0.46	5.80
	CAL13	9.44	7.54	8.01	7.95	8.09	測定せず	7.95	7.91	7.54	8.09	0.21	2.69
	CAL14	10.10	8.43	9.01	9.15	9.50	7.87	9.25	8.87	7.87	9.50	0.61	6.84
	CAL15	11.60	10.72	11.60	13.47	11.30	9.73	11.80	11.44	9.73	13.47	1.25	10.90
	CAL16	12.50	11.16	11.65	11.14	11.53	10.37	12.11	11.33	10.37	12.11	0.59	5.21
平均値									9.64			0.66	8.20
実試料	1		3.82	3.96	3.83	3.74	3.61	3.91	3.81	3.61	3.96	0.13	3.31
	2		3.22	3.32	3.08	3.11	2.99	3.32	3.17	2.99	3.32	0.13	4.22
	3		1.04	0.91	0.76	0.99	1.02	1.13	0.98	0.76	1.13	0.13	12.96
	4		2.67	2.73	2.64	2.60	2.56	2.73	2.65	2.56	2.73	0.07	2.61
	5		2.34	2.31	2.20	2.27	2.28	2.36	2.29	2.20	2.36	0.05	2.39
	6		1.46	1.35	1.16	1.40	1.41	1.50	1.38	1.16	1.50	0.12	8.65
	7		1.99	1.98	1.91	1.91	1.86	2.06	1.95	1.86	2.06	0.07	3.64
	8		14.67	15.13	14.69	14.66	13.54	14.62	14.55	13.54	15.13	0.53	3.66
	9		0.92	0.79	0.67	0.90	0.89	1.00	0.86	0.67	1.00	0.12	13.37
	10		1.05	0.91	0.75	1.01	1.02	1.12	0.98	0.75	1.12	0.13	13.39
	11		0.98	0.88	0.75	0.97	0.95	1.08	0.93	0.75	1.08	0.11	11.71
	12		0.90	0.77	0.57	0.87	0.88	0.97	0.83	0.57	0.97	0.14	17.09
	13		1.02	0.94	0.83	0.97	1.01	1.13	0.98	0.83	1.13	0.10	10.05
	14		4.57	4.69	4.68	4.49	4.22	4.58	4.54	4.22	4.69	0.17	3.84
	15		0.99	0.88	0.68	0.96	0.98	1.06	0.92	0.68	1.06	0.13	14.31
	16		1.49	1.41	1.22	1.43	1.43	1.57	1.42	1.22	1.57	0.11	8.07
	17		1.23	1.13	0.91	1.20	1.18	1.31	1.16	0.91	1.31	0.14	11.80
	18		1.57	1.50	1.34	1.50	1.47	1.63	1.50	1.34	1.63	0.10	6.66
	19		6.74	7.01	6.82	6.65	6.23	6.73	6.70	6.23	7.01	0.26	3.92
	20		2.35	2.34	2.25	2.24	2.17	2.40	2.29	2.17	2.40	0.09	3.77
	21		1.55	1.52	1.35	1.50	1.49	1.64	1.51	1.35	1.64	0.09	6.26
	22		1.69	1.66	1.50	1.63	1.60	1.78	1.64	1.50	1.78	0.09	5.58
	23		1.82	1.75	1.62	1.76	1.71	1.88	1.76	1.62	1.88	0.09	5.15
	24		1.75	1.69	1.58	1.69	1.65	1.81	1.70	1.58	1.81	0.08	4.79
	25		1.43	1.35	1.19	1.38	1.37	1.53	1.37	1.19	1.53	0.11	8.09
	26		1.45	1.34	1.16	1.39	1.37	1.52	1.37	1.16	1.52	0.12	8.95
	27		1.96	1.96	1.87	1.93	1.85	2.11	1.95	1.85	2.11	0.09	4.79
	28		0.92	0.79	0.65	0.88	0.88	1.01	0.86	0.65	1.01	0.12	14.35
	29		0.36	0.18	0.14	0.33	0.38	0.49	0.31	0.14	0.49	0.13	41.91
	30		0.36	0.19	0.12	0.33	0.40	0.48	0.31	0.12	0.48	0.13	42.75
	31		0.71	0.59	0.48	0.69	0.72	0.82	0.67	0.48	0.82	0.12	17.89
	32		0.48	0.32	0.22	0.46	0.50	0.59	0.43	0.22	0.59	0.13	31.50
平均値									2.12			0.13	10.98

実試料標準物質候補品及び各社標準液の反応性確認　　TBIL (酸化法)

実試料標準物質候補品の回帰直線の比較

	測定法					
	A	B	C	D	E	F
実試料の傾き	0.9927	0.9648	1.0628	0.9853	1.0303	0.9642
実試料標準物質候補品の傾き	0.9880	0.9157	1.0267	0.9818	1.1167	0.9711
実試料とほぼ同じ傾き	○			○		○

各社キャリブレータと実試料標準物質候補品の相対誤差の比較

No		平均測定値	測定法						相対誤差±3%以内	相対誤差±2%以内
			A	B	C	D	E	F		
1	CAL 1	1.19	-1.42	-0.11	-4.62	-0.63	3.02	3.44	3	3
2	CAL 2	7.94	4.18	1.81	-16.74	3.40	5.41	2.54	2	1
3	CAL 3	12.20	-6.62	-3.43	17.11	-1.75	-7.26	1.29	2	2
4	CAL 4	7.01	-4.51	-2.71	5.28	3.33	-4.41	3.05	1	0
5	CAL 5	0.95	-2.08	-2.85	13.97	-4.25		3.95	2	0
6	CAL 6	20.41	-2.25	-0.70	-1.61	3.68		4.29	2	1
7	CAL 7	9.80	-0.11	4.37	-15.13	3.08	6.13	2.34	2	1
8	CAL 8	27.23	1.04	1.86	-11.64	2.49	-0.36	7.64	4	3
9	CAL 9	0.75	-9.90	-5.07	27.76	-4.62	-4.82	4.24	0	0
10	CAL 10	8.54	-5.68	-3.90	7.66	3.91	-4.53	2.40	1	0
11	CAL 11	18.66	-5.68	-4.15	5.28	4.06	-4.75	5.18	0	0
12	CAL 12	8.66	-4.02	-0.44	2.99	4.45	-3.80	0.89	3	2
13	CAL 13	8.39	-3.52	-0.59	1.81	4.13		1.52	3	3
14	CAL 14	9.58	-5.60	-2.25	2.12	6.93	-4.67	3.65	2	0
15	CAL 15	12.32	-6.79	-2.64	15.85	-1.31	-8.42	2.85	3	1
16	CAL 16	12.20	-2.05	-1.30	-3.06	1.69	-1.47	6.59	4	3
17	S1 1mg/dL	1.28	-4.13	-1.78	18.84	-1.86	-6.90	-1.94	3	3
18	S2 5mg/dL	5.58	-1.37	-2.66	-0.11	-0.02	7.17	-3.47	3	2
19	S3 10mg/dl	10.95	-0.88	-3.49	-1.79	-0.13	7.75	-1.82	4	4
20	S4 20mg/d	21.59	-0.70	-4.78	-2.34	-0.41	7.62	0.34	4	3

血清総ビリルビン測定結果集計　　ジアゾ法

測定値

		表示値	測定法 A	B	C	D	E	F	平均値	MIN.	MAX.	SD	CV
実試料標準物質候補品	S1	1.10	1.08	1.21	1.30	0.98	1.37	1.50	1.24	0.98	1.50	0.19	15.52
	S2	5.10	5.16	5.23	5.75	4.64	5.33	6.43	5.42	4.64	6.43	0.61	11.23
	S3	10.10	10.45	10.81	11.23	9.50	10.37	12.54	10.82	9.50	12.54	1.02	9.43
	S4	20.10	21.54	21.33	22.40	20.42	20.51	24.71	21.82	20.42	24.71	1.59	7.30
各社のｷｬﾌﾞﾚｰﾀ	CAL1	1.00	1.01	1.30	1.27	0.98	1.22	1.42	1.20	0.98	1.42	0.17	14.36
	CAL2	8.29	8.28	8.87	8.78	7.62	8.08	9.10	8.45	7.62	9.10	0.56	6.62
	CAL3	11.40	12.24	11.46	13.20	12.24	12.30	12.89	12.39	11.46	13.20	0.60	4.86
	CAL4	6.80	7.77	7.24	8.19	5.32	7.14	8.17	7.31	5.32	8.19	1.07	14.61
	CAL5	0.80	0.75	1.07	1.07	0.94	0.98	ゼロ	0.96	0.75	1.07	0.13	13.91
	CAL6	21.00	23.33	19.34	23.96	23.50	22.05	ゼロ	22.44	19.34	23.96	1.87	8.34
	CAL7	11.00	9.26	9.08	10.38	9.05	9.60	11.34	9.79	9.05	11.34	0.91	9.29
	CAL8		over	23.10	29.78	30.65	27.71	30.69	28.39	23.10	30.69	3.19	11.25
	CAL9	0.83	0.62	0.70	0.82	0.67	0.79	0.92	0.75	0.62	0.92	0.11	14.66
	CAL10	9.83	9.45	7.71	10.03	9.36	9.22	10.43	9.37	7.71	10.43	0.93	9.96
	CAL11	21.45	20.11	16.77	21.74	23.33	18.47	22.89	20.55	16.77	23.33	2.58	12.58
	CAL12	9.25	9.71	9.22	10.20	8.75	9.39	10.39	9.61	8.75	10.39	0.62	6.44
	CAL13	9.44	8.68	8.62	9.86	9.43	9.29	測定せず	9.18	8.62	9.86	0.53	5.73
	CAL14	10.10	8.91	7.32	10.46	8.75	9.08	10.97	9.25	7.32	10.97	1.31	14.12
	CAL15	11.60	10.29	11.53	13.41	12.37	12.23	12.94	12.13	10.29	13.41	1.11	9.12
	CAL16	12.50	10.86	14.96	14.47	12.10	13.11	14.60	13.35	10.86	14.96	1.63	12.19
平均値									10.94			1.08	10.50
実試料	1		3.66	4.02	4.33	3.75	4.21	4.75	4.12	3.66	4.75	0.40	9.75
	2		3.60	3.50	3.70	3.41	3.71	4.09	3.67	3.41	4.09	0.24	6.48
	3		0.98	1.09	1.12	0.88	1.22	1.25	1.09	0.88	1.25	0.14	13.03
	4		2.82	2.88	2.97	2.69	2.95	3.40	2.95	2.69	3.40	0.24	8.24
	5		2.39	2.48	2.56	2.28	2.54	3.05	2.55	2.28	3.05	0.27	10.40
	6		1.52	1.58	1.64	1.39	1.72	1.83	1.61	1.39	1.83	0.16	9.65
	7		2.11	2.28	2.21	2.14	2.27	2.48	2.25	2.11	2.48	0.13	5.83
	8		14.65	15.62	15.56	15.42	15.35	17.72	15.72	14.65	17.72	1.04	6.62
	9		0.85	0.98	1.00	0.88	1.14	1.16	1.00	0.85	1.16	0.13	12.79
	10		1.05	1.05	1.12	0.88	1.17	1.25	1.09	0.88	1.25	0.13	11.83
	11		0.98	1.08	1.08	0.88	1.14	1.23	1.07	0.88	1.23	0.12	11.63
	12		0.88	1.00	0.99	0.77	1.12	1.12	0.98	0.77	1.12	0.14	13.89
	13		1.10	1.15	1.21	1.01	1.29	1.36	1.19	1.01	1.36	0.13	10.69
	14		4.90	4.91	5.02	4.61	4.95	5.47	4.98	4.61	5.47	0.28	5.66
	15		0.90	1.08	1.06	0.81	1.15	1.19	1.03	0.81	1.19	0.15	14.30
	16		1.12	1.66	1.71	1.49	1.80	1.92	1.62	1.12	1.92	0.28	17.41
	17		1.10	1.32	1.35	1.08	1.47	1.49	1.30	1.08	1.49	0.18	13.50
	18		1.45	1.66	1.73	1.49	1.83	1.89	1.67	1.45	1.89	0.18	10.57
	19		5.47	6.80	7.32	6.62	7.23	8.23	6.95	5.47	8.23	0.91	13.16
	20		2.54	2.53	2.57	2.38	2.64	2.90	2.59	2.38	2.90	0.17	6.66
	21		1.58	1.73	1.72	1.56	1.80	1.94	1.72	1.56	1.94	0.14	8.28
	22		1.72	1.89	1.86	1.66	1.87	2.09	1.85	1.66	2.09	0.15	8.17
	23		1.83	1.99	2.01	1.83	2.04	2.28	2.00	1.83	2.28	0.17	8.33
	24		1.84	1.94	1.93	1.83	2.01	2.22	1.96	1.83	2.22	0.14	7.27
	25		1.12	1.54	1.58	1.39	1.62	1.82	1.51	1.12	1.82	0.24	15.59
	26		1.49	1.65	1.62	1.39	1.64	1.83	1.60	1.39	1.83	0.15	9.42
	27		2.17	2.29	2.17	2.11	2.19	2.50	2.24	2.11	2.50	0.14	6.28
	28		0.92	1.02	0.98	0.81	1.09	1.16	1.00	0.81	1.16	0.13	12.61
	29		0.40	0.43	0.39	0.26	0.46	0.49	0.40	0.26	0.49	0.08	19.76
	30		0.45	0.43	0.38	0.26	0.49	0.49	0.42	0.26	0.49	0.09	20.86
	31		0.74	0.86	0.82	0.67	0.93	0.95	0.83	0.67	0.95	0.11	13.07
	32		0.53	0.56	0.52	0.36	0.64	0.63	0.54	0.36	0.64	0.10	18.64
平均値									2.36			0.22	11.26

血清総ビリルビン測定結果集計　　ジアゾ法

補正：　実資料標準物質候補品の表示値（10mg/100mL）

			測定法										
		表示値	A	B	C	D	E	F	平均値	MIN.	MAX.	SD	CV
各社のｷｬﾌﾞﾚｰﾀ	CAL1	1.00	0.97	1.21	1.14	1.04	1.19	1.14	1.12	0.97	1.21	0.09	8.15
	CAL2	8.29	8.00	8.28	7.90	8.10	7.87	7.33	7.91	7.33	8.28	0.32	4.09
	CAL3	11.40	11.83	10.71	11.87	13.01	11.98	10.38	11.63	10.38	13.01	0.95	8.19
	CAL4	6.80	7.51	6.77	7.37	5.66	6.95	6.58	6.81	5.66	7.51	0.66	9.74
	CAL5	0.80	0.72	1.00	0.97	1.00	0.96	ゼロ	0.93	0.72	1.00	0.12	12.73
	CAL6	21.00	22.55	18.06	21.56	24.98	21.49	ゼロ	21.73	18.06	24.98	2.49	11.46
	CAL7	11.00	8.95	8.48	9.34	9.63	9.35	9.14	9.15	8.48	9.63	0.40	4.36
	CAL8		over	21.58	26.79	32.59	27.00	24.72	26.54	21.58	32.59	4.02	15.16
	CAL9	0.83	0.60	0.65	0.74	0.71	0.77	0.74	0.70	0.60	0.77	0.06	9.17
	CAL10	9.83	9.14	7.20	9.02	9.95	8.98	8.40	8.78	7.20	9.95	0.92	10.50
	CAL11	21.45	19.43	15.67	19.56	24.80	17.99	18.44	19.32	15.67	24.80	3.03	15.70
	CAL12	9.25	9.38	8.61	9.18	9.30	9.15	8.37	9.00	8.37	9.38	0.41	4.53
	CAL13	9.44	8.39	8.05	8.87	10.03	9.05	測定せず	8.88	8.05	10.03	0.75	8.49
	CAL14	10.10	8.61	6.84	9.41	9.30	8.85	8.84	8.64	6.84	9.41	0.93	10.79
	CAL15	11.60	9.95	10.77	12.06	13.16	11.92	10.43	11.38	9.95	13.16	1.20	10.58
	CAL16	12.50	10.49	13.97	13.02	12.87	12.77	11.76	12.48	10.49	13.97	1.20	9.62
平均値									10.31			1.10	9.58
実試料	1		3.54	3.76	3.90	3.99	4.10	3.83	3.85	3.54	4.10	0.20	5.10
	2		3.48	3.27	3.33	3.62	3.62	3.30	3.44	3.27	3.62	0.16	4.72
	3		0.95	1.01	1.01	0.93	1.19	1.00	1.02	0.93	1.19	0.09	9.03
	4		2.73	2.69	2.67	2.86	2.88	2.74	2.76	2.67	2.88	0.09	3.17
	5		2.31	2.32	2.30	2.42	2.48	2.45	2.38	2.30	2.48	0.08	3.35
	6		1.47	1.47	1.47	1.48	1.67	1.48	1.51	1.47	1.67	0.08	5.42
	7		2.04	2.13	1.99	2.28	2.21	2.00	2.11	1.99	2.28	0.12	5.60
	8		14.16	14.59	14.00	16.39	14.96	14.28	14.73	14.00	16.39	0.88	6.00
	9		0.82	0.91	0.90	0.93	1.11	0.93	0.93	0.82	1.11	0.09	10.00
	10		1.02	0.98	1.01	0.93	1.14	1.01	1.01	0.93	1.14	0.07	6.71
	11		0.95	1.01	0.97	0.93	1.11	0.99	0.99	0.93	1.11	0.06	6.30
	12		0.85	0.93	0.89	0.82	1.09	0.90	0.91	0.82	1.09	0.09	10.39
	13		1.06	1.07	1.09	1.08	1.26	1.10	1.11	1.06	1.26	0.07	6.63
	14		4.74	4.59	4.51	4.90	4.82	4.41	4.66	4.41	4.90	0.19	4.04
	15		0.87	1.01	0.95	0.86	1.12	0.96	0.96	0.86	1.12	0.10	9.98
	16		1.09	1.55	1.54	1.59	1.76	1.55	1.51	1.09	1.76	0.22	14.82
	17		1.07	1.24	1.21	1.15	1.43	1.20	1.22	1.07	1.43	0.12	10.02
	18		1.40	1.55	1.55	1.59	1.78	1.52	1.57	1.40	1.78	0.12	7.84
	19		5.28	6.35	6.59	7.04	7.05	6.63	6.49	5.28	7.05	0.65	10.03
	20		2.45	2.36	2.31	2.53	2.58	2.34	2.43	2.31	2.58	0.11	4.48
	21		1.53	1.62	1.55	1.66	1.75	1.57	1.61	1.53	1.75	0.08	5.22
	22		1.66	1.76	1.67	1.77	1.82	1.69	1.73	1.66	1.82	0.06	3.75
	23		1.77	1.86	1.81	1.95	1.98	1.84	1.87	1.77	1.98	0.08	4.43
	24		1.78	1.81	1.73	1.95	1.96	1.79	1.84	1.73	1.96	0.10	5.23
	25		1.09	1.44	1.42	1.48	1.58	1.47	1.41	1.09	1.58	0.17	11.90
	26		1.44	1.54	1.45	1.48	1.60	1.47	1.50	1.44	1.60	0.06	4.18
	27		2.09	2.14	1.96	2.24	2.13	2.01	2.10	1.96	2.24	0.10	4.84
	28		0.89	0.95	0.88	0.86	1.07	0.94	0.93	0.86	1.07	0.07	7.95
	29		0.39	0.40	0.35	0.28	0.45	0.39	0.38	0.28	0.45	0.06	15.65
	30		0.43	0.40	0.34	0.28	0.48	0.39	0.39	0.28	0.48	0.07	18.10
	31		0.72	0.80	0.73	0.71	0.90	0.77	0.77	0.71	0.90	0.07	9.29
	32		0.51	0.53	0.47	0.38	0.62	0.51	0.50	0.38	0.62	0.08	15.41
平均値									2.21			0.14	7.80

血清総ビリルビン測定結果集計　　ジアゾ法

補正:　実資料標準物質候補品との回帰式

		表示値	測定法 A	B	C	D	E	F	平均値	MIN.	MAX.	SD	CV
各社のｷｬﾌﾞﾚｰﾀ	CAL1	1.00	1.19	1.25	1.08	1.42	0.99	1.01	1.16	0.99	1.42	0.17	14.28
	CAL2	8.29	7.92	8.37	7.85	7.87	7.80	7.30	7.85	7.30	8.37	0.34	4.34
	CAL3	11.40	11.58	10.81	11.83	12.36	11.98	10.41	11.49	10.41	12.36	0.74	6.46
	CAL4	6.80	7.45	6.84	7.31	5.64	6.86	6.54	6.77	5.64	7.45	0.65	9.55
	CAL5	0.80	0.94	1.04	0.91	1.39	0.76	ゼロ	1.01	0.76	1.39	0.24	23.50
	CAL6	21.00	21.85	18.21	21.53	23.29	21.66	ゼロ	21.31	18.21	23.29	1.87	8.77
	CAL7	11.00	8.83	8.56	9.29	9.27	9.30	9.14	9.07	8.56	9.30	0.30	3.36
	CAL8		over	21.75	26.76	30.23	27.27	24.99	26.20	21.75	30.23	3.12	11.92
	CAL9	0.83	0.83	0.68	0.68	1.12	0.57	0.60	0.75	0.57	1.12	0.21	27.58
	CAL10	9.83	9.00	7.28	8.97	9.57	8.93	8.39	8.69	7.28	9.57	0.79	9.05
	CAL11	21.45	18.87	15.80	19.53	23.12	18.10	18.60	19.00	15.80	23.12	2.39	12.56
	CAL12	9.25	9.24	8.70	9.13	8.97	9.10	8.36	8.92	8.36	9.24	0.33	3.68
	CAL13	9.44	8.29	8.14	8.82	9.63	9.00	測定せず	8.78	8.14	9.63	0.60	6.82
	CAL14	10.10	8.50	6.92	9.36	8.97	8.79	8.83	8.56	6.92	9.36	0.85	9.97
	CAL15	11.60	9.78	10.87	12.02	12.49	11.92	10.45	11.25	9.78	12.49	1.05	9.34
	CAL16	12.50	10.30	14.10	12.97	12.22	12.78	11.81	12.36	10.30	14.10	1.27	10.31
平均値									10.20			0.93	10.72
実試料	1		3.64	3.81	3.84	4.12	3.96	3.74	3.85	3.64	4.12	0.17	4.35
	2		3.59	3.32	3.27	3.78	3.47	3.20	3.44	3.20	3.78	0.22	6.42
	3		1.16	1.05	0.95	1.32	0.99	0.87	1.06	0.87	1.32	0.16	15.45
	4		2.86	2.74	2.61	3.09	2.71	2.64	2.77	2.61	3.09	0.18	6.36
	5		2.46	2.36	2.24	2.69	2.31	2.34	2.40	2.24	2.69	0.16	6.54
	6		1.66	1.51	1.41	1.82	1.49	1.35	1.54	1.35	1.82	0.17	11.24
	7		2.21	2.17	1.93	2.55	2.03	1.88	2.13	1.88	2.55	0.24	11.47
	8		13.82	14.72	13.96	15.45	15.01	14.37	14.55	13.82	15.45	0.63	4.31
	9		1.04	0.95	0.84	1.32	0.91	0.80	0.98	0.80	1.32	0.19	19.48
	10		1.23	1.02	0.95	1.32	0.94	0.87	1.06	0.87	1.32	0.18	16.98
	11		1.16	1.05	0.91	1.32	0.91	0.86	1.04	0.86	1.32	0.18	17.39
	12		1.07	0.97	0.83	1.22	0.89	0.77	0.96	0.77	1.22	0.17	17.56
	13		1.27	1.11	1.03	1.46	1.06	0.96	1.15	0.96	1.46	0.18	16.02
	14		4.79	4.65	4.46	4.95	4.69	4.33	4.64	4.33	4.95	0.22	4.79
	15		1.09	1.05	0.89	1.26	0.92	0.82	1.00	0.82	1.26	0.16	15.81
	16		1.29	1.59	1.48	1.92	1.57	1.42	1.55	1.29	1.92	0.21	13.82
	17		1.27	1.27	1.15	1.52	1.24	1.07	1.26	1.07	1.52	0.15	12.26
	18		1.60	1.59	1.49	1.92	1.59	1.40	1.60	1.40	1.92	0.18	11.08
	19		5.31	6.43	6.53	6.91	6.96	6.59	6.45	5.31	6.96	0.60	9.25
	20		2.60	2.41	2.25	2.79	2.40	2.22	2.45	2.22	2.79	0.21	8.76
	21		1.72	1.66	1.49	1.99	1.57	1.44	1.64	1.44	1.99	0.20	12.01
	22		1.84	1.80	1.61	2.09	1.64	1.56	1.76	1.56	2.09	0.20	11.13
	23		1.95	1.90	1.75	2.25	1.80	1.72	1.90	1.72	2.25	0.20	10.34
	24		1.95	1.85	1.67	2.25	1.78	1.66	1.86	1.66	2.25	0.22	11.86
	25		1.29	1.48	1.36	1.82	1.39	1.34	1.45	1.29	1.82	0.19	13.41
	26		1.63	1.58	1.39	1.82	1.41	1.34	1.53	1.34	1.82	0.18	11.85
	27		2.26	2.19	1.90	2.52	1.96	1.89	2.12	1.89	2.52	0.25	11.80
	28		1.11	0.98	0.82	1.26	0.87	0.80	0.97	0.80	1.26	0.18	18.50
	29		0.63	0.43	0.29	0.73	0.24	0.25	0.43	0.24	0.73	0.21	48.55
	30		0.67	0.43	0.28	0.73	0.27	0.25	0.44	0.25	0.73	0.21	48.32
	31		0.94	0.83	0.67	1.12	0.70	0.63	0.82	0.63	1.12	0.19	23.17
	32		0.74	0.56	0.41	0.83	0.42	0.36	0.55	0.36	0.83	0.19	34.72
平均値									2.23			0.22	15.16

実試料標準物質候補品及び各社標準液の反応性確認　　TBIL (ジアゾ法)

実試料標準物質候補品の回帰直線の比較

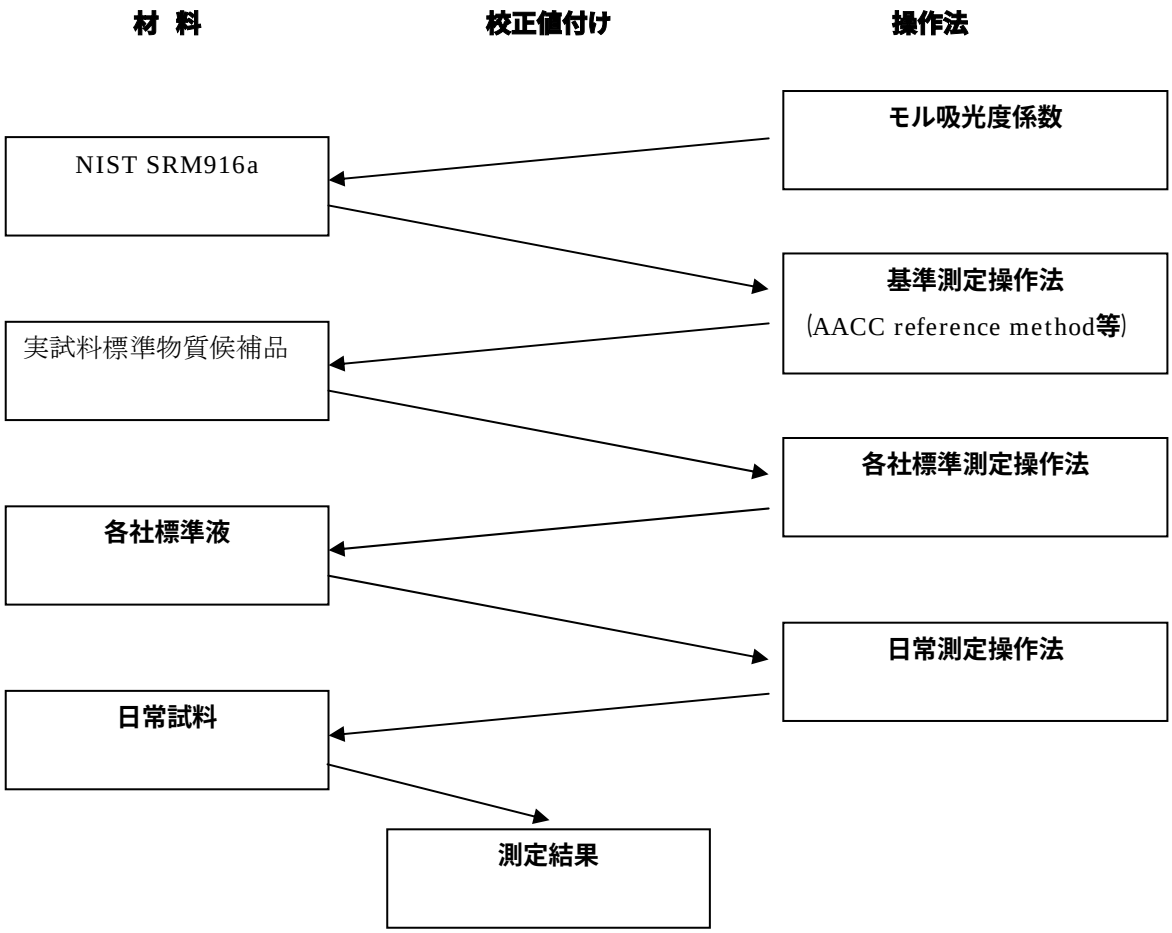
	測定法					
	A	B	C	D	E	F
実試料の傾き	0.9193	0.9882	0.9993	0.9756	0.9863	1.1313
実試料標準物質候補品の傾き	0.9953	0.9798	1.0229	0.9291	0.9479	1.1249
実試料とほぼ同じ傾き		○				○

各社キャリブレータと実試料標準物質候補品の相対誤差の比較

No		平均測定値	測定法						相対誤差±3%以内	相対誤差±2%以内
			A	B	C	D	E	F		
1	CAL 1	1.20	-7.12	8.48	3.78	-5.96	-3.10	2.76	1	0
2	CAL 2	8.45	6.73	6.02	3.64	-3.50	-6.72	-5.12	0	0
3	CAL 3	12.39	7.63	-6.45	6.39	0.72	1.58	-8.18	2	2
4	CAL 4	7.31	16.03	0.16	11.77	-1.60	-24.30	-1.47	2	2
5	CAL 5	0.96	-14.16	11.19	8.65	-7.81	21.05		0	0
6	CAL 6	22.44	13.22	-12.84	6.76	0.17	7.01		1	1
7	CAL 7	9.79	3.12	-6.26	5.92	-0.79	-4.49	2.24	2	1
8	CAL 8	28.39		-17.69	4.88	-0.38	10.15	-4.50	1	1
9	CAL 9	0.75	-8.23	-7.91	6.00	-8.19	17.29	4.62	0	0
10	CAL 10	9.37	10.00	-16.85	6.88	-0.48	3.26	-1.83	2	2
11	CAL 11	20.55	6.51	-17.46	5.74	-8.46	16.05	-1.64	1	1
12	CAL 12	9.61	10.11	-3.01	5.94	-1.18	-6.03	-4.62	1	1
13	CAL 13	9.18	3.04	-5.05	7.26	2.35	6.20		1	0
14	CAL 14	9.25	5.01	-19.97	12.85	-0.75	-2.27	4.61	2	1
15	CAL 15	12.13	-7.59	-3.91	10.41	2.28	4.93	-5.85	1	1
16	CAL 16	13.35	-11.41	13.30	8.28	-0.32	-6.88	-3.48	1	1
17	S1 1mg/dL	1.24	-4.23	-2.05	3.08	2.75	-7.08	5.02	2	0
18	S2 5mg/dL	5.42	3.84	-2.58	5.56	-1.67	-10.39	4.44	2	1
19	S3 10mg/dL	10.82	5.28	1.05	3.64	-2.91	-9.49	2.26	3	1
20	S4 20mg/dL	21.82	7.49	-1.13	2.63	-4.22	-4.35	0.01	3	2

別紙２

トレーサビリティ連鎖



■ ３．外部発表、講演等

・講演など

１．濱崎直孝：JCCLS 臨床検査標準化基本検討委員会について、日本臨床化学会年会及び日本臨床検査医学会総会、福岡、2005 年 11 月

２．高木　康、濱崎直孝：臨床検査値の互換性の確保のための実証実験、日本臨床化学会年会及び日本臨床検査医学会総会、福岡、2005 年 11 月

３．千葉光一：臨床検査標準物質の開発・供給、日本学術会議標準研究連絡委員会、東京、2005 年 9 月

４．千葉光一：Joint Committee on Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM)活動概要、JCCLS 講演会、東京、2005 年 10 月

５．千葉光一、高津章子：臨床検査の標準化に向けた取り組み柱１－臨床検査標準物質の開発、日本臨床化学会年会及び日本臨床検査医学会総会、福岡、2005 年 11 月

６．千葉光一：バイオ分野における標準物質開発の現状、バイオエンジニアリング研究会、東京、2005 年 12 月

７．Koichi Chiba, Katshiko Kuwa, Katsuhiko Yamamoto： Laboratory Medicine Standardization Activity in Japan, 2005, JCTLM Meeting, Paris, 2005. 11.

８．Katsuhiko Kuwa：Reliability and commutability of clinical laboratory data and reference materials in laboratory medicine, BioJapna 2005, 横浜, 2005 年 9 月

９．桑　克彦：臨床検査の標準化―国の施策になった医療統計量と我々の役割、第 20 回臨床検査メリトクラシー研究会、東京、2005 年 9 月

10．桑　克彦：実試料系標準物質の設定概要、JCCLS 講演会、東京, 2005 年 10 月

11．桑　克彦：国内外における標準化の流れ、平成 17 年度日本臨床化学会関東支部例会、東京、2005 年 10 月

12．桑　克彦：常用標準物質の整備について、第 52 回日本臨床検査医学会総会・第 45 回日本臨床化学会年会連合大会、福岡、 2005 年 11 月

13．桑　克彦：不確かさを用いた新しい QC の方法，第 52 回日本臨床検査医学会総会・第 45 回日本臨床化学会年会連合大会、福岡、 2005 年 11 月

14．桑　克彦：ISO とトレーサビリティ、不確かさ，第 29 回日本臨床検査医学会東北支部例会、福島、 2005 年 11 月

15．桑　克彦：不確かさ評価と全国ネットでの標準化作業概要，平成 17 年度茨城県臨床衛生検査技師会臨床化学分野精度管理報告会、水戸、 2006 年 1 月

・その他（標準物質開発の状況）

本研究開発により、JCTLM データベースへのノミネーションの準備が終了し、2006 年 4 月に申請の標準物質は以下のとおり

・グルコース標準物質(血清)

・クレアチニン標準物質(血清)

・尿酸標準物質(血清)

■ ４．謝　辞

本研究は（独）新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）が支援する知的基盤創成・利用促進研究開発事業として行われたものである。NEDO 主催の本事業により、臨床検査の標準化に携わる多数の研究機関、臨床検査薬メーカー、臨床化学研究者、試薬メーカー技術者、計量標準研究者が集結して「臨床検査用標準物質の研究開発」の研究を推進できたことは非常に意義深い。さらに本研究が医療における安心・安全に大きく寄与することができ、もって今後の国民医療への多大な貢献が期待されるものである。

なお、本研究の実施に当たり、（社）日本臨床検査薬協会および同協会加盟メーカーから貴重なる助言および多大なる協力を得たことに謝意を表する。

また、実試料標準物質のプロトタイプの調整あるいは作製については、有限責任中間法人 HECTEF スタンダードレファレンスセンター、旭化成ファーマ㈱、シスメックス㈱およびオリエンタル酵母工業㈱の協力を得たことに謝意を表する。